Série A, N° 4576
N° d'ordre : 5423

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Monique CASTAGNA

PREMIÈRE THÈSE

Isolement et étude de l'hépatocyte
Application en physiologie cellulaire

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

La cellule de Küpffer

Soutenues le 4 Juin 1965 devant la Commission d'examen

M. COUTEAUX *Président*
Mlle LE BRETON } *Examinateurs.*
M. FONTAINE }

VILLENEUVE-SUR-LOT
IMPRIMERIE BADOR

1965

Série A, N° 4576
N° d'ordre : 5423

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Monique CASTAGNA

PREMIÈRE THÈSE

Isolement et étude de l'hépatocyte
Application en physiologie cellulaire

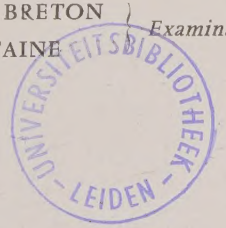
DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

La cellule de Küpffer

Soutenues le 4 Juin 1965 devant la Commission d'examen

M. COUTEAUX *Président*
M^lle LE BRETON
M. FONTAINE *Examinateurs.*



VILLENEUVE-SUR-LOT
IMPRIMERIE BADOR

1965

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544306_0057

FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen .... M. ZAMANSKY.

BRELOT	T	Analyse supérieure.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparée.
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay).
AUGER	T	Physique quantitative et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITE	T	Chimie générale.
N...	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
BOCQUET	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) et Sédiment (Orsay)
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécanique exp. des fluides.
DRACH	T	Zoologie.
QUENEY	T	Météo et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du globe.
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DU BREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électrique.
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théorie physique.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristallographie.

J.-P. Mathieu ..... T Physique optique.
Couteaux ..... T Cytologie.
May ..... T Zoologie.
Choquet ..... T Théorie des fonctions et topologie.
Feldmann ..... T Biologie végétale marine.
Guinier ..... T Physique des solides (Orsay).
Jost ..... T Physiologie comparée.
Fortet ..... T Calcul des probabilités et physique math.
Schwartz ..... T Calcul dif. et intégral.
Chouard ..... T Physiologie végétale.
Malavard ..... T Aviation (technique aéronautique).
Normant ..... T Synthèse organique.
Benard ..... T Chimie minérale.
Buvat ..... T Botanique (E.N.S.).
Dugue ..... T Statistiques mathématiques.
Soulairac ..... T Psychophysiologie.
Ulrich ..... T Physiologie végétale appliquée.
Maréchal ..... T Optique théorique et appliquée.
Kirrmann ..... T Théories chimiques.
Chadefaud ..... T Botanique.
Mlle Le Breton ..... T Physiologie de la nutrition.
Lelong ..... T Application de l'analyse à la géométrie.
Devillers ..... T Anatomie et histol. comparée.
Ehresmann ..... T Topologie algébrique.
Francon ..... T Physique (S.P.C.N.).
Glangeaud ..... T Géographie physique et Géologie.
Dodement ..... T Mathématiques (M.G.P.).
Pisot ..... T Technique mathématique de la physique.
Roch ..... T Géologie.
Schatzmann ..... T Astrophysique.
Termier ..... T Géologie générale.
Zamansky ..... T Mathématiques générales.
Lennuier ..... T Physique (M.G.P.).
Rizet ..... T Génétique (Orsay).
Routhier ..... T Géologie appliquée.
Mme Tonnelat ..... T Physique théorique.
Dixmier ..... T Mathématiques (M.P.C.).
Souchay ..... T Chimie générale.
Aigrain ..... T Electrotechnique générale.
Brusset ..... T Chimie systématique.
M. Lévy ..... T Physique théor. des hautes énergies (Orsay).
Mme Chaix ..... T Chimie biologique.
Mme Hurelpy ..... T Biologie végétale (P.C.B.).
Pannetier ..... T Chimie générale.
Brun ..... T Mécanique des fluides I.
Lederer ..... T Chimie biologique (Orsay).
Mme Dubreil ..... T Mathématiques (agrégation).
Mme Lelong ..... T Mathématiques II (E.N.S.).
Bellair ..... T Géologie (S.P.C.N.).
Cotte ..... T Physique électricité.
Dubois J.-E. ..... T Chimie organique.
Lamotte ..... T Zoologie (E.N.S.).
Michel A. ..... T Chimie minérale (Orsay).
Olmer ..... T Energétique générale.
Rouault ..... T Electricité (Orsay).
Gauthier ..... T Mécanique appliquée.
Barchewitz ..... T Chimie physique.
Brossel ..... T Physique atomique.
Buser ..... T Physiologie comparée.
Camus ..... T Physiologie végétale.
Castaing ..... T Physique II therm. (Orsay).

Curien	T	Minéralogie et Cristallographie.
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay).
Mme Charniaux-Cotton	T	Evolution des êtres organisés.
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Tonnelat	T	Bio-physico-chimie (Orsay).
Ville	T	Econométrie.
Willemart	T	Chimie (P.C.B.).
Dode	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet	T	Biologie végétale (S.P.C.N., Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay).
Germain	T	Mécanique théorique des fluides.
Lucas	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Physique des particules fondament. (Orsay).
Bricard	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard	T	Psychologie, Physiologie.
Friedel	T	Physique des solides (Orsay).
M. Julia	T	Etudes des molécules complexes.
Lender	T	Biologie animale (S.P.C.N., Orsay).
Magat	T	Physicochimie des radioéléments.
Mle Quintin	T	Electrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiologie animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemée	T	Ecologie végétale (Orsay).
Guérin	T	Chimie (M.P.C., Orsay).
Chatelet	T	Chimie (P.C.B.).
Jean	T	Physiol. nucléaire (Orsay).
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.).
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Electronique (Orsay).
Bouissières	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Therm. et méc. physique.
Ellemberger	T	Géologie des grandes rég. du globe (Orsay).
Franc	T	Biologie animale (P.C.B.).
Schnell		Botanique tropicale.
Stolkowski	T	Physiologie végétale.
Acher	T	Chimie biologique.
Baudoin	T	Biologie animale (P.C.B.).
Beaumont		Biologie animale (S.P.C.N.).
Blamont		Géophysique ionosphère.
Boureau	T	Botanique.
Curie D.		Physique (M.G.P.).
Durand-Delga	T	Géologie.
Fréon	T	Chimie organique (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.).
Magnan		Physique électricité.
Daudel	T	Mécanique ondul. appl. à la chim. théor. et à la physique nucléaire.

Mlle Fourcroy		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat.		Mécanique analytique et mécan. céleste.
Mlle Veil	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécanique phys. et expérimentale.
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
Brochard	T	Physique (P.C.B., Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay).
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie physique et géograph. dynam.
Comolet		Mécanique des fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale (Orsay).
Delloue	T	Physique de l'exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale (P.C.B.).
Jullien J.		Chimie (S.P.C.N., Orsay).
Malgrange	T	Technique mathém. de la physique (Orsay).
Olivier		Antropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique (E.N.S., Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathématiques (E.N.S. féminines).
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique (S.P.C.N.).
Amat	T	Physique (P.C.B.).
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Bougis		Biologie marine, Villefranche-sur-Mer.
Bruhat	T	Mathématiques (M.P.C.).
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabbal	T	Physique (M.G.P., Orsay).
Deheuvels	T	Mathématiques propéd.
D'Espagnat	T	Physique théorique (Orsay).
Furon	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme Gans	T	Génétique.
Geneves		Biologie végétale (P.C.B.).
Guilbert		Physique (C.U.S., Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie (P.C.B.).
Meyer		Physique propéd.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétrographie.
Roseau	T	Mécanique théorique des fluides.
Roubine		Electronique.
Silber	T	Chimie (P.C.B.).
Uebersfeld	T	Electronique.
Yvon	T	Théories physiques.
Hervé	T	Mathématiques.
Néron	T	Mathématiques (M.P.C., Orsay).
Mme Pecker-Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique (M.P.C.).
Le Corre	T	Electricité.
Delcroix	T	Physique théorique (Orsay).
Gourdin		Physique théor. des hautes énerg. (Orsay).
Lehmann	T	Physique expérim. des hautes énergies.

Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Echalier		Biologie animale (P.C.B.).
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret		Physiologie végétale (Orsay).
Dars		Géologie structurale et Géologie appliquée.
Camefort	T	Botanique (agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Blaquiere		Electronique (Orsay).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (C.S.U., Orléans).
Mallevin	T	Mathématiques propéd. (Orsay).
Gaudemar		Chimie propéd.
Perez y Jorba		Physique expérim. des hautes énerg. (Orsay).
David	T	Chimie (agrégation Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérimentale.
Lazard		Mathématiques (M.P.C.).
Morel Pierre		Physique (M.P.C.).
Arsac		Programmation.
Lefebvre		Chimie (M.P.C.).
Chapeville		Biochimie.
Benoit		Physique (C.P.E.M.).
Rio		Chimie (C.P.E.M.).
Jauzein		Géologie (E.N.S.).
Prévost Georges		B.V. (C.P.E.M.).
Favard P.		B.A. (C.P.E.M.).
Vilkas		Chimie (C.P.E.M.).
Mlle Ficini		Chimie (C.P.E.M.).
Lequeux		Astronomie.
Cohen-Tannoudji		Physique (M.P.C.).
Tavernier		Physique (C.P.E.M.).
Mme Roizen		Physique (C.P.E.M.).
Durand M.		B.A. (S.P.C.N.).
Pascaud		Physiologie.
Mme Petit		B.A. (C.P.E.M.).
Brousse		Géologie (Orsay).
Cagniac		Physique (agrégation Orsay).
Leberre		Zoologie (Orsay).
Scheffer		Microbiologie (Orsay).
De Gennes		Physique des solides (Orsay).
Riou		Physique nucléaire expériment. (Orsay).
Clauser		Chimie biologique (Orsay).
Chevalier		Physiologie animale (Orsay).
Jancovici		Physique atomique (Orsay).
Falk-Vairant		Physique nucléaire (Orsay).
Fetizon		Chimie propéd. (Orsay).
Cerf		Mathématiques (Orsay).

Le Secrétaire général ..... R. Poullain.

ISOLEMENT ET ÉTUDE DE L'HÉPATOCYTE

A M^lle^ Le Breton, Professeur à la Faculté des Sciences, et Directeur du Centre de Recherches sur la Cellule normale et cancéreuse, je tiens à exprimer combien je lui suis reconnaissante de m'avoir persuadée que le métier de chercheur était le plus passionnant des métiers, de m'avoir donné l'occasion de m'en convaincre au cours de ces huit années de recherches et enfin de m'avoir fait vivre dans le rayonnement de sa personnalité.

Je la prie de bien vouloir accepter l'hommage de ce travail.

M. le Professeur COUTEAUX m'a fait l'honneur d'accepter de présider le Jury de cette thèse et de manifester son intérêt à l'objet de ces recherches ; qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à M. le Professeur FONTAINE, membre de l'Institut, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce mémoire de thèse avec une attention bienveillante.

Je suis heureuse de trouver ici l'occasion d'exprimer ma reconnaissance à M. le Professeur TERROINE, Directeur du Centre national de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation, de l'intérêt qu'il n'a cessé de manifester à mes recherches et de m'avoir fait part des enseignements de sa riche expérience.

Si ce mémoire a vu le jour, je le dois à M. J. CHAUVEAU, Maître de recherches au C.N.R.S., qui m'a orienté vers l'étude des cellules isolées dont il avait pressenti l'intérêt et qui, par son assistance quotidienne, m'a permis de mener à bien ce travail. Je tiens à lui en exprimer ma profonde gratitude, et à l'assurer de mon entier dévouement.

Mes remerciements vont également à tous les chercheurs du Centre qui, soit par leur expérience, soit par leur exemple, soit par le réconfort de leur amitié, m'ont apporté une aide précieuse tout au long de la réalisation de ce travail. Je suis particulièrement redevable à Mlle Y. MOULÉ, Maître de recherches au C.N.R.S., pour avoir guidé mon apprentissage, pour m'avoir prodigué ses conseils et pour avoir su me communiquer l'enthousiasme que suscite en elle notre métier.

M. le Professeur ROUILLER a bien voulu réaliser les micrographies électroniques, je l'en remercie d'autant plus vivement que la mise au point technique fut longue et laborieuse.

Que Mlles M.-P. VALLÉE et N. DARRACQ, dont la compétence technique et l'efficacité m'ont permis de mener à bien la fin de l'expérimentation, trouvent ici l'expression de mes remerciements et de ma sympathie. Je remercie enfin Mme CLOLUS et Mlle LAURENT, qui ont assuré la présentation matérielle de ce mémoire.

INTRODUCTION

Il peut, a priori, sembler surprenant de consacrer à l'hépatocyte un ensemble de recherches, alors que de toutes les cellules de mammifère, la cellule hépatique est sans aucun doute la plus étudiée. Parmi les très nombreuses recherches dont elle est l'objet, celles qui relèvent de la Biochimie portent sur deux matériaux fort différents : les coupes fines (20 à 30 cellules d'épaisseur) et les homogénats (ou suspensions de structures intracellulaires) de tissu hépatique. Cette introduction a pour propos d'exposer les raisons qui nous ont conduit à substituer à ces deux objets d'étude l'hépatocyte isolé. Dès 1942, Elliott et Libet, puis Anderson (1956), Turba et Hilpert (1961) et de Duve (1962) ont souligné les limitations que présentent la coupe et l'homogénat tout en reconnaissant, par ailleurs, l'extrême fécondité de leur application.

La coupe fine conservant intacte l'architecture de la plupart des cellules qui la constituent a été depuis Warburg l'objet de recherches concernant le métabolisme : glycolyse et respiration, uréogenèse, transaminations et synthèses diverses, phénomènes mettant en œuvre des multi-systèmes enzymatiques qui catalysent des réactions en chaîne. Les limitations propres à la coupe tiennent pour une part à son caractère compact s'opposant à la libre diffusion des métabolites et donnant lieu à des réponses asynchromes, à la perte dans les milieux d'incubation de constituants solubles, également à la difficulté d'obtenir des prélèvements identiques.

Mais c'est à partir de *l'homogénat* que les structures intracellulaires révélées par le microscope électronique ont pu être isolées grâce au développement des méthodes de centrifugation différentielle. Les perfectionnements de ces dernières ont permis d'obtenir à l'état pur les noyaux, mitochondries, formations

microsomiales, phase disperse, afin d'établir leur constitution chimique et leurs activités enzymatiques ainsi que les interrelations et rôles physiologiques au sein de la cellule. Cette analyse des phénomènes cellulaires a été réalisée sur l'homogénat ; cependant l'interprétation des résultats ainsi obtenus est difficile. Cela tient, selon nous, essentiellement à deux causes : le broyage lui-même qui entraîne le bouleversement de l'architecture cellulaire, notamment la disparition de la membrane et la libération d'enzymes hydrolytiques par rupture des lysosomes, la dilution des constituants cellulaires solubles de la phase cytoplasmique, etc., et, d'autre part, l'hétérogénéité du tissu à partir duquel l'homogénat est obtenu, mélange de plusieurs types de cellules qui diffèrent par leur origine, leur nature et leurs fonctions.

Dès lors, la question se pose de savoir si on ne peut substituer à l'homogénat un autre objet d'étude, les cellules en tant qu'*individus isolés d'un tissu,* et séparées par type. Il ne peut donc s'agir de cellules récoltées après culture *in vitro,* lesquelles ont donné lieu à des études de valeur incontestable, mais dont la signification est, à notre avis, très différente de celles fournies par les cellules provenant d'un tissu. Les cellules cultivées se sont multipliées en dehors de l'organisme, échappant depuis plusieurs générations aux régulations nerveuse et hormonale, aux interactions des organes de l'individu. Seules, les cellules isolées à partir d'organes fraîchement prélevés peuvent nous permettre d'approcher la cellule *in situ.*

Beaucoup d'arguments plaident a priori en faveur des cellules isolées comme matériel de recherches.

1° Les cellules isolées offrent la possibilité d'expérimenter sur une *population cellulaire homogène.* La plupart des tissus animaux sont hétérogènes, notamment le tissu hépatique, qui est une mosaïque d'au moins quatre types cellulaires : les cellules parenchymateuses ou hépatocytes, les cellules des canaux biliaires, les cellules conjonctives et les cellules littorales. Parmi celles-ci il est possible de distinguer depuis les travaux de Yamagishi (1959) les cellules endothéliales et de Küpffer, et les cellules péricapillaires. Les hépatocytes, qui représentent 85 % du volume de l'organe, mais seulement 60 % du nombre des cellules, sont eux-mêmes hétérogènes puisque certains d'entre eux sont multinucléés et polyploïdes, et ce à des degrés divers.

2° La cellule isolée représente un objet vivant, simplifié, défini, échappant aux régulations autres qu'intracellulaires ; elle

doit donc permettre de saisir ces régulations en fonction des divers états réalisés chez l'animal au moment du sacrifice.

3° Elle conserve intacte son architecture générale, ses structures demeurent en place et elle entretient au travers de sa membrane des échanges immédiats avec le milieu extérieur. Elle se présente donc *théoriquement* comme l'objet de choix pour les investigations portant sur la structure de la membrane externe et sur la perméabilité cellulaire.

4° La cellule isolée pourrait devenir un précieux matériel d'étude en ce qui concerne les problèmes d'Immunologie.

5° La cellule isolée doit permettre l'approche *directe* d'un phénomène cellullaire, en le rapportant à l'unité fonctionnelle. Les études biochimiques appliquées à l'homogénat de tissu hépatique tentent d'atteindre cette unité par le recours au DNA. Nous reviendrons en troisième partie sur ce problème.

Sauf quelques rares types cellulaires, les macrophages libres (lymphocytes, monocytes et autres leucocytes) et les cellules d'ascite, les cellules sont agrégées en tissus solides. Cette agrégation implique comme stade préalable à toute étude un traitement du tissu qui provoquera sa dispersion sous forme de suspension de cellules entières ayant subi le minimum d'agressions.

Les méthodes d'isolement de cellules à partir de tissus solides déjà décrites conduisent-elles à l'obtention des cellules présentant les qualités énoncées ci-dessus, qui en feraient un matériel de choix pour les recherches de Biologie cellulaire chez les animaux supérieurs ? L'examen critique des publications concernant l'application de ces méthodes ne permet pas de conclure, car, si la première tentative d'isolement des cellules remonte à 1916 (Rous et Jones), leur utilisation en vue d'études métaboliques est récente et fragmentaire (*) ; il apparaît seulement que le comportement métabolique — souvent perturbé — est étroitement dépendant de la nature du traitement appliqué et du milieu d'environnement.

Ceci nous a conduit, en premier lieu, à envisager l'élaboration, à partir du foie de Rat, d'une technique d'isolement des hépatocytes et cellules de Küpffer qui préserverait au maximum les propriétés des cellules *in situ* et, ensuite, à entreprendre l'étude biochimique et métabolique des hépatocytes pour tenter

(*) Le Page, 1953 ; Laws et Stickland, 1956 ; Kalant et Young, 1957 ; Henley et coll., 1959 ; Berry, 1962 ; Scarpinato, 1963 ; Rodbell. 1964 ; Exton, 1964.

d'illustrer, à propos de ce type cellulaire, l'intérêt méthodologique présenté par les cellules isolées.

*
* *

Ce mémoire comprend cinq parties :

Dans la première partie, nous exposons les diverses techniques d'analyse appliquées aux suspensions de cellules, mais en développant uniquement nos apports personnels dans ce domaine. La méthode d'obtention des cellules en types et classes définis fait l'objet de la deuxième partie ; nous justifions les principales étapes de cette méthode.

C'est dans la troisième partie que sont rassemblés, sous forme de tableaux ou courbes accompagnés de commentaires, les résultats obtenus à partir des hépatocytes entiers et de leurs structures intracellulaires isolées. Ils y sont confrontés à ceux obtenus sur l'homogénat de tissu hépatique.

Dans la quatrième partie, nous avons groupé nos investigations sur quelques activités métaboliques des hépatocytes normaux : glycolyse et respiration, synthèses protéique et ribonucléique. De l'ensemble de ces résultats nous avons dégagé des conclusions partielles concernant les caractéristiques de l'hépatocyte par rapport à celles du tissu dont il provient.

La cinquième partie de ce mémoire développe la possibilité de fractionner sur gradient de densité les hépatocytes en classes ayant des caractéristiques spécifiques ; enfin, nous donnons deux exemples d'application de cette notion expérimentale de classes au foie en hypertrophie compensatrice ou au foie porteur d'hépatome.

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUES D'ANALYSES

I. — ANALYSES BIOCHIMIQUES

A. — Estimation des acides nucléiques et des phospholipides.

Les constituants nucléiques et lipidiques sont extraits séparément par la méthode de Schmidt et Thannhauser (1945) modifiée par Moulé (1953). Le précipité perchlorique initial dans le cas des suspensions cellulaires est lavé trois fois, car le milieu de suspension contient un polysaccharide de synthèse : le Ficoll, qui interfère avec le dosage du ribose.

Les teneurs en phospholipides et acide désoxyribonucléique sont exprimées par le contenu en phosphore des extraits correspondants ; ce dernier est dosé selon la technique de Machebœuf et Delsal (1943) avec réduction de l'acide phosphomolybdique par l'hydroquinone. L'acide ribonucléique est estimé par le dosage du ribose (méthode de Mejbaum, 1939) et exprimé également par son contenu en phosphore.

La méthode d'extraction de Schneider (1945) a été utilisée toutes les fois que le dosage fractionné des acides nucléiques n'était pas recherché.

B. — Dosage de l'azote.

Cette détermination a porté, d'une part, sur le contenu en azote total du tissu et, d'autre part, sur l'hydrolysat alcalin

---

Abréviations utilisées. — ADP : Adénosine diphosphate ; ATP : Adénosine triphosphate ; DAB : Diméthylaminobenzène ; DNA : Acide désoxyribonucléique ; DNA.P : phosphore de l'acide désoxyribonucléique ; DOC : Désoxycholate de sodium ; d.p.m. : désintégrations par minute ; NAD : Niacinamide adénine dinucléotide ; $NADH_2$: Niacinamide adénine dinucléotide réduit ; NP : Azote protéique ; NT : Azote total ; PL : Phospholipides ; PL.P : Phosphore des phospholipides ; RNA : Acide ribonucléique ; RNA.P : Phosphore de l'acide ribonucléique ; RNAse : ribonucléase ; Tris : Trishydroxyméthylaminométhane.

obtenu au cours du fractionnement selon Schmidt et Thannhauser, conduisant ainsi au contenu en azote des protéines et des acides nucléiques tissulaires. Après minéralisation sulfurique, le dosage d'azote a été effectué soit par la réaction de Nessler, soit par la technique de Russel (1944) mise au point pour l'autoanalyseur Technicon.

C. — Dosage des acides aminés libres.

La méthode décrite par Moore et Stein (1954) a été modifiée pour rendre possible son application à l'extrait acido-soluble en milieu perchlorique 5 %.

Les réactions ont lieu dans des tubes à bouchon rodé. Pour chaque essai, on ajoute 1 ml de l'extrait perchlorique à doser, 1 ml de citrate de sodium 0,1 M et 1 ml du réactif à la ninhydrine-hydrindantine préparé extemporanément. Les tubes bouchés sont maintenus 15 min. au bain-marie bouillant, puis les milieux réactionnels sont amenés à 10 ml avec l'alcool éthylique à 50 %. Les tubes sont refroidis dans l'eau courante puis agités fortement pendant 30 sec. pour faciliter l'oxydation de l'hydrindantine en excès. L'absorption des solutions est mesurée à 570 mμ, 15 min., exactement après la sortie du bain-marie.

La courbe d'étalonnage est obtenue avec une solution de leucine 0,1 mM préparée dans le citrate de sodium 0,1 M. Ces échantillons sont traités comme les échantillons à doser : à la prise de solution étalon, il est ajouté le complément à 1 ml de citrate 0,1 M et 1 ml d'acide perchlorique 5 % de telle sorte que la réaction ait lieu à *p*H 1,5 ; les réactions sont effectuées simultanément.

L'effet propre du citrate n'a pas été étudié en milieu perchlorique ; il est possible que, ne pouvant jouer son rôle de tampon, il puisse être supprimé sans modifier la réaction.

Notons que la coloration n'est pas aussi stable que dans les conditions de la technique originale (*p*H = 5,5), mais qu'en opérant dans les conditions qui viennent d'être précisées les valeurs trouvées ont une bonne reproductibilité et permettent de doser jusqu'à 0,05 μmole de leucine. Pour certains dosages, la sensibilité de la réaction a encore été augmentée en supprimant la dilution par l'alcool ; nous pouvons doser ainsi moins de 0,02 μmole de leucine.

Les teneurs en acides aminés sont exprimées directement en équivalents de leucine.

D. — Extraction et dosage des lipides totaux et du cholestérol.

Le milieu de suspension des cellules est éliminé par centrifugation dans un tube de verre. Le culot après séchage de quelques heures, à 4° C, est repris par l'alcool absolu. Ensuite les lipides sont extraits dans le kumagawa et le contenu en lipides totaux est déterminé par pesée.

Le cholestérol des cellules, sous forme libre et estérifié, est dosé par la réaction de Liebermann (modifiée par Burchard, 1890), appliquée au résidu lipidique.

E. — Dosage du glycogène.

Nous avons appliqué la technique de Kemp et Kits Van Heijningen (1954) qui permet de doser la quantité de glycogène plus glucose d'un tissu. Au préalable, les cellules sont lavées trois fois avec une solution physiologique pour éliminer complètement le Ficoll du milieu de suspension qui serait hydrolysé en milieu sulfurique.

F. — Dosage de l'acide lactique.

Il a été effectué par la méthode de Barker et Summerson (1941).

G. — Evaluation du volume sanguin du foie.

La méthode appliquée (Castagna, 1965) comporte :

1° Une extraction complète de l'hémoglobine du tissu après action du désoxycholate de Na (DOC) suivie d'un dosage spécifique de cette dernière ;

2° L'estimation du volume du sang d'un homogénat par comparaison avec le sang du même animal.

Le mode opératoire implique une perfusion du foie avec une solution isotonique après isolement d'un lobe (lobe médian) par ligature. Au préalable, un échantillon de sang est prélevé par ponction cardiaque. Le lobe isolé et les lobes perfusés sont homogénéisés isolément avec 39 volumes (nous tenons compte de la dilution du tissu perfusé par le milieu de perfusion, voir chapitre I de la troisième partie) d'une solution physiologique contenant 0,5 % de DOC qui « solubilise » les structures

membranaires. Ces homogénats sont centrifugés 30 min. à 150 000 g_m : la pellicule formée est éliminée et l'extrait surnageant parfaitement limpide est prélevé. L'absorption de l'extrait du lobe isolé (d_h) est mesurée par rapport à celle de l'extrait des lobes perfusés à 542 mμ. Parallèlement, l'absorption du sang recueilli (d_s) est mesurée après dilution au 1/200 avec la solution de DOC à 0,5 %.

Le contenu en sang des homogénats, exprimé en ml pour 100 g de foie, est calculé par la formule :

$$\frac{d_h \times 20}{d_s}$$

il a été aussi exprimé en g de sang pour 100 g de foie en adoptant 1,054 comme poids spécifique du sang.

Nous avons montré que ce procédé permet d'écarter les erreurs inhérentes aux techniques usuelles : *l'adsorption* de l'hémoglobine sur les structures cellulaires, le *trouble* des préparations et *l'interférence des substances colorées* du foie :

a) L'extrait de l'homogénat traité au DOC a un spectre d'absorption caractéristique de l'oxyhémoglobine (*fig.* 1) ; il est limpide et l'interférence des substances colorées du foie est éliminée par le choix du tissu perfusé comme témoin optique. Ce dosage est spécifique de l'hémoglobine ;

b) La courbe obtenue en portant en ordonnées les absorptions d'un homogénat perfusé auquel on ajoute des quantités connues et croissantes de sang, et en abscisses les quantités de sang, est une droite passant par l'origine. Ceci apporte la preuve de l'extraction totale de l'hémoglobine.

Cette technique peut être utilisée quel que soit le mode de sacrifice de l'animal. Elle est applicable à tous les tissus perfusables.

H. — Détermination colorimétrique de l'argent (Castagna, 1961).

L'argent est injecté aux rats sous forme d'un colloïde : Le Collargol (Prolabo). Il n'est pas toxique à la dose injectée : 10 mg par rat. Au niveau du foie, il est phagocyté par les cellules de Küpffer, exclusivement. L'animal est sacrifié quelques heures plus tard, les suspensions cellulaires sont alors préparées normalement.

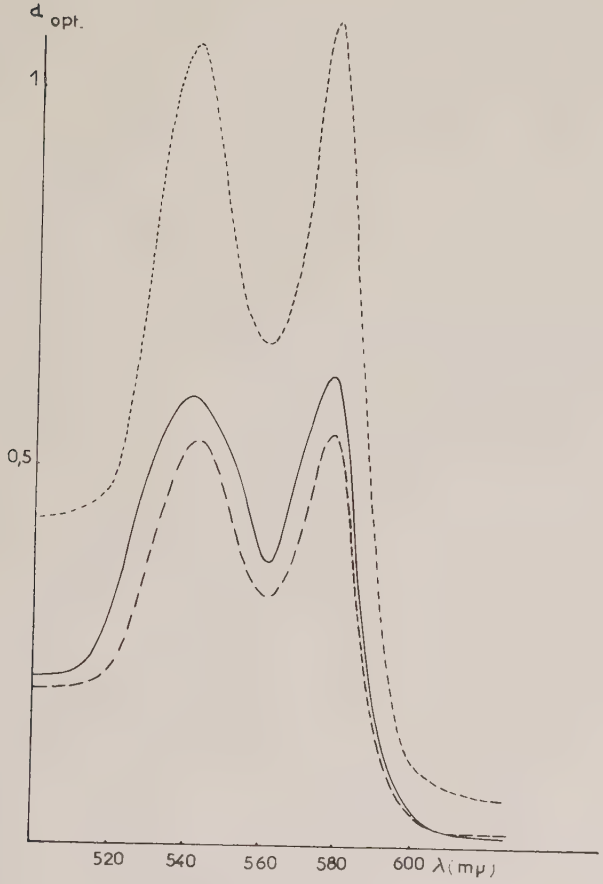


Fig. 1

Spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.

---------- sang dilué à 1 % avec le sérum physiologique ;
— — — sang dilué à 0,5 % avec le DOC 0,5 % ;
——— extrait de l'homogénat à 2,5 % en présence de DOC 0,5 %.

Les méthodes colorimétriques de dosage de l'ion Ag^+ sont inapplicables aux milieux biologiques en milieu neutre ou acide ; en effet, une proportion d'Ag^+ passe à l'état de AgCl insoluble et échappe à la réaction ; par contre, en milieu ammo-

niacal, AgCl est décomposé et Ag^+ passe à l'état d'argentodiammine : $Ag(NH_3)_2^+$ soluble. Enfin, les méthodes néphélométriques et hétérométriques de dosage du AgCl sont inapplicables aux microdosages. C'est pourquoi nous nous sommes proposé de mettre au point un dosage de l'ion $Ag(NH_3)_2^+$.

Le réactif utilisé est le *p*-diméthylaminobenzilidène rhodanine dissous dans le méthylcellosolve à la concentration de 2.10^{-3} M.

Le dosage est effectué entièrement, depuis la minéralisation jusqu'au développement de la coloration dans un matras de microkjeldahl jaugé, à col étroit. La matière organique est oxydée par une minéralisation sulfonitrique, après quoi on ajoute au contenu des matras environ 5 ml d'eau puis 0,5 ml d'une solution d'urée à 20 %. Le milieu acide est alors neutralisé et amené à *p*H 9,3 avec 1 ml de NH_4OH RP. Après refroidissement et addition de 1,5 ml de gélatine à 1 %, le mélange est vigoureusement agité, 0,5 ml du réactif est déposé alors à la surface du liquide et rapidement mélangé. Enfin, le milieu est ajusté à 10 ml avec l'eau distillée et l'absorption est mesurée 20 min. plus tard au photomètre Meunier sous 2 cm d'épaisseur, avec l'écran 530 pour des valeurs d'Ag^+ comprises entre 10 et 100 µg ou au spectrophotomètre sous 5 cm d'épaisseur à 535 mµ pour des valeurs d'Ag^+ inférieures à 10 µg.

Les courbes d'étalonnage obtenues (*fig.* 2) ne sont pas rigoureusement des droites, ce qui est conforme à l'étude théorique que nous en avons faite (Castagna et Chauveau, 1961).

Nous avons pu montrer qu'entre Ag^+ et la rhodanine deux complexes peuvent se former suivant leur concentration relative. En présence d'un excès d'Ag, le complexe prédominant est le composé équi-moléculaire AgRh ; lorsque la rhodanine est en excès le composé formé répond à la formule $AgRh_2$. Les deux complexes existent simultanément; nous avons déterminé les constantes apparentes d'équilibre :

$$k'_1 = 5.10^{-5}$$
$$k'_2 = 1{,}5.10^{-7}$$

et la constante de dismutation Q' qui régit l'équilibre

$$2\ AgRh \rightleftharpoons Ag + AgRh_2$$
$$\text{est}\quad Q' = 3.10^{3}$$

En outre, nous avons établi que parmi les métaux, seuls Hg^{++}, Ce^{+++}, Cu^{++} et Au^{+++} dans les conditions adoptées réagissaient

avec la rhodanine. Nous avons éliminé l'effet de ces ions, à l'exception de Au^{+++} : l'ion Hg^{++} par addition de versène, l'ion Ce^{+++} par filtration de Ce $(OH)_3$ insoluble en milieu ammoniacal et l'ion Cu^{+} par oxydation. Dans le cas du foie, la spécificité du dosage est absolue.

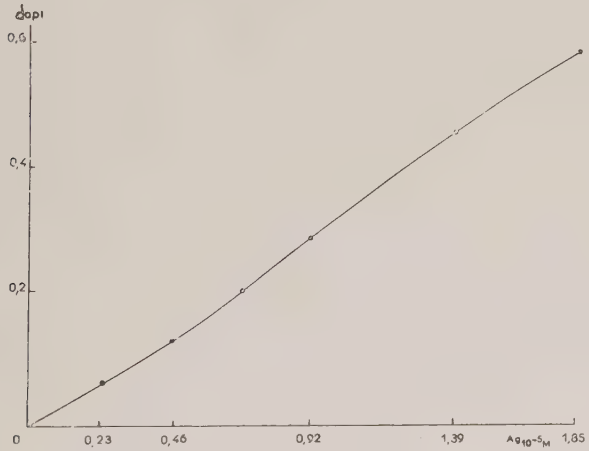


FIG. 2

Courbe d'étalonnage du dosage d'argent.
Cuve de 5 cm, $\lambda = 535$ mμ.

II. — TECHNIQUES MANOMÉTRIQUES.

La consommation d'oxygène par les cellules est mesurée à 30° C dans l'air, chaque fiole de Warburg contenant environ 30 mg de tissu. Les pressions sont notées de 10 en 10 min. pendant 40 min. et le $Q\,O_2$ est exprimé en μl O_2 consommés en 20 min. par mg d'azote. L'oxydation de quelques hydrates de carbone, intermédiaires du cycle de Krebs et acides gras, a été étudiée ; la composition des différents milieux d'incubation est donnée en quatrième partie, chapitre I.

L'activité de la succinoxydase est déterminée par une technique manométrique décrite au paragraphe suivant.

III. — Mesures des activités enzymatiques.

L'activité de la lactate déshydrogénase est déterminée spectrophotométriquement, selon la méthode de Kornberg (1951), par la mesure de la vitesse d'oxydation du $NADH_2$ dans un milieu contenant : pyruvate de Na 0,3 mM, tampon phosphate 0,03 M à *p*H 7,4, $NADH_2$ 0,06 mM. Nous opérons à 20-22° C.

Les phosphatases alcaline et acide, la glucose 6-phosphatase et l'adénosine triphosphatase sont évaluées par la mesure du phosphore inorganique libéré après incubation à 37° C, la réaction étant, dans tous les cas, stoppée par addition d'acide perchlorique concentré. Le Ficoll interfère légèrement dans le développement de la réaction de Machebœuf-Delsal, ce qui impose d'étalonner le dosage du phosphore en présence de Ficoll aux concentrations utilisées ou de reprendre, après lavage, les cellules en milieu physiologique. L'activité de la phosphatase alcaline sensible ou non aux ions Mg^{++} est mesurée par la méthode d'Allard et coll. (1954) dans le milieu réactionnel : β-glycérophosphate 0,02 M, tampon véronal 0,02 M à *p*H 11 et celle de la phosphatase acide par la méthode de Wattiaux et de de Duve (1956), modifiée en présence de : β-glycérophosphate 0,04 M, acétate de sodium 0,04 M à *p*H 5, chlorure de magnésium 0,012 M, après une préincubation de 1 heure. Une activité adénosine triphosphatasique est déterminée par la méthode de Dubois et Potter (1943) dans le milieu suivant : adénosine triphosphate 0,02 M, tampon véronal 0,01 M à *p*H 7,4 et chlorure de calcium 0,003 M. La glucose 6-phosphatase est mesurée par une modification de la méthode de Hers et coll. (1951) en présence de glucose 6-phosphate 0,01 M, tampon histidine 0,03 M à *p*H 6,5 et versène 0,001 M.

Toutes ces activités enzymatiques sont exprimées en µµmoles de substrat oxydé ou hydrolysé par min. et par cellule.

Le milieu réactionnel pour la mesure de l'activité de la succinoxydase selon la méthode de Schneider et Potter (1943) est le suivant : succinate de sodium 0,05 M, tampon phosphate 0,03 M à *p*H 7,4, cytochrome *c* $1{,}3.10^{-5}$ M, chlorure de calcium $0{,}4.10^{-3}$ M et chlorure d'aluminium $0{,}4.10^{-3}$ M. Cette activité est exprimée en µµl O_2, soit par min. et par cellule, soit par 20 min. et par mg d'azote.

IV. — INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS DANS LES ACIDES NUCLEIQUES ET LES PROTEINES CELLULAIRES, MESURE DES ACTIVITES ^{3}H ET ^{14}C.

A. — Marquage isotopique.

L'acide orotique, précurseur des bases pyrimidiques, « marque » spécifiquement le RNA en l'absence de multiplication cellulaire. Il est injecté au rat par voie intrapéritonéale ou ajouté au milieu d'incubation des cellules sous forme d'orotate de sodium 6-^{14}C d'activité spécifique : 25,5 mc/mM.

La thymidine (méthyle-^{3}H) d'activité = 4 c/mM ou la thymidine 6-^{3}H d'activité 12,6 c/mM s'incorpore dans le DNA, donc dans les tissus en voie de multiplication. La radioactivité injectés intrapéritonéalement est comprise entre 0,2 et 0,5 µc par g de rat.

L'incorporation *in vitro* de *dl*-leucine 1-^{14}C d'activité spécifique = 3,8 mc/mM dans les protéines tissulaires a lieu à 37° C, dans deux milieux d'incubation. Cet acide aminé n'est pas un précurseur des bases puriques.

B. — Mesure des activités spécifiques.

La radioactivité des échantillons est déterminée avec le spectromètre à scintillation en phase liquide de Packard (Tricarb, modèle 3003). Le scintillateur est un mélange dans le toluène de 2,5-diphényloxazole à 0,4 % et de 1,4 *bis*-2-(5-phényloxazolyl)-benzène à 0,01 %.

1° Cas des acides nucléiques.

L'extraction est normale à ceci près que le précipité perchlorique initial est lavé 5 fois afin d'éliminer le précurseur radioactif. Après ce traitement, la radioactivité du dernier extrait acido-soluble tombe à moins de 1 % de la radioactivité initiale. Des contrôles montrent qu'il n'y a pas contamination des autres fractions extraites, ni échange du radioélément.

L'alcool éthylique absolu assure la miscibilité de l'échantillon (phase aqueuse) dans le scintillateur. Comme cette addition provoque un effet d'« absorption » sur les rayonnements de faible énergie, la radioactivité mesurée de l'échantillon est toujours comparée à celle d'une solution étalon du précurseur en présence d'acide perchlorique 5 ou 10 %, d'alcool absolu et de scintillateur dans les mêmes proportions.

Dans nos conditions de mesure de l'activité du RNA : 0,1 ml de l'extrait perchlorique 5 % + 3 ml d'alcool + 10 ml de scintillateur, nous retrouvons 65 % de la radioactivité. Pour la mesure de l'activité du DNA : 0,2 ml de l'extrait perchlorique 10 % + 3 ml d'alcool + 10 ml de scintillateur, le rendement est de 20 %. Remarquons à ce sujet que si, dans le premier cas, l'addition d'acide perchlorique est sans effet, elle abaisse le rendement d'environ 10 % dans le second cas.

L'activité spécifique de l'échantillon est exprimée en désintégrations par min. par mg de RNA.P ou de DNA.P.

2° Cas des protéines.

Le résidu de l'extraction des lipides et des acides nucléiques (méthode de Schneider) représente la fraction protéique. Les protéines sont séchées par deux passages à l'acétone et un séjour de quelques min. dans un courant d'air puis mises en solution dans l'acide formique. La dissolution est immédiate si le séchage n'a pas été trop prolongé. La radioactivité et l'azote sont dosés sur des fractions aliquotes de cette solution.

Notons que l'acido-insoluble des préparations non incubées conserve une radioactivité non négligeable que la multiplication des lavages ne peut éliminer, pas plus qu'une alcalinisation légère du milieu. Afin d'y remédier, nous opérons de la façon suivante : le nombre de lavages étant limité à cinq (l'activité de l'extrait acido-soluble est alors égale à moins de 2 % de l'activité des protéines), l'activité des protéines non incubées est déduite de celle des protéines incubées ; cela nuit toutefois à la précision de ces déterminations.

Nous avons mesuré l'activité des échantillons par deux procédés :

a) *Précipitation des protéines sur filtre.* — 0,2 ml de la solution protéique est déposé sur disque de papier Whatman 3 MM. Le disque séché est déposé dans 4 ml du scintillateur ; les standards aqueux sont également déposés sur disque de papier. Dans ces conditions, le rendement atteint 55 %.

Pour des volumes connus et croissants d'une solution de protéines marquées *in vivo*, nous remarquons que les activités ne s'inscrivent pas sur une droite, mais décrivent une courbe qui s'infléchit (*fig.* 3). Pour un même volume, en faisant varier l'épaisseur du dépôt (filtres de papier Whatman d'épaisseur variée) nous avons obtenu des activités identiques. Il ne s'agit donc pas d'un phénomène d'auto-absorption analogue à celui

observé en couche mince, mais vraisemblablement d'un effet de la coloration des protéines (« color quenching ») sur la fluorescence du scintillateur.

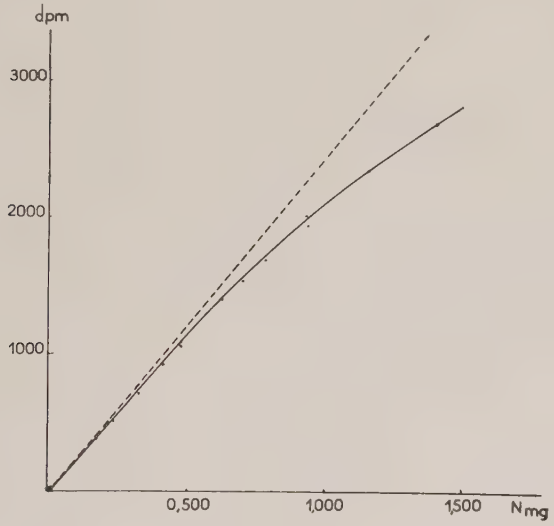


FIG. 3

Effet de « quenching » des protéines.

Nous déterminons graphiquement le coefficient de « quenching » α pour une quantité donnée de protéines par le rapport de l'activité mesurée à l'activité repérée sur la tangente à la courbe expérimentale à l'origine. Si x est l'activité mesurée, l'activité réelle sera : $X = \frac{x}{\alpha}$.

Cet effet est négligeable au-dessous de 200 µg d'azote.

b) *Addition au scintillateur de la solution formique des protéines.* — L'alcool absolu permet, ici encore, de réaliser une phase ternaire. La présence d'acide formique est sans effet sur l'activité de l'échantillon et le rendement atteint 77 % quand à 0,1 ml de solution formique on ajoute 3 ml d'alcool et 10 ml de scintillateur.

Ce dernier procédé, plus simple, plus rapide et plus sensible que le précédent, lui a finalement été substitué.

V. — TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT DES STRUCTURES INTRACELLULAIRES

Les structures intracellulaires ont été isolées suivant la technique de Chauveau (1960) en milieu saccharose 0,88 M, adaptée de la façon suivante au matériel étudié :

1° Les cellules sont lavées dans le saccharose 0,88 M et centrifugées 15 min. à 1 200 g_m avant d'être reprises par un petit volume (au plus 5 ml) de saccharose 0,88 M. Cette centrifugation a pour but d'éliminer plus complètement le milieu de suspension et ainsi d'abaisser la concentration en électrolytes du milieu d'homogénéisation ;

2° L'homogénéisation se fait en deux temps de 3 min. entrecoupés par une centrifugation de 2 min. à 750 g_m.

La fraction nucléaire étant contaminée par un grand nombre de cellules, les noyaux ont été isolés directement par densité. Les autres étapes du fractionnement ne sont pas modifiées : nous obtenons ainsi les mitochondries, puis la fraction « microsomes » et la phase soluble cytoplasmique.

Les noyaux sont isolés dans le saccharose 2,2 M (Chauveau, 1952) en présence de $CaCl_2$ 5.10^{-5} M. Après 15 déplacements du piston, il reste encore beaucoup de cellules intactes. Le sédiment obtenu est transparent et ne contient que des noyaux. La présence des ions Ca^{++} est indispensable à leur sédimentation, il semble même que les ions Mg^{++} ne puissent s'y substituer.

VI. — EXAMENS MORPHOLOGIQUES

Pour l'observation microscopique nous utilisons la Nigrosine à 0,25 %, qui s'est révélée un bon colorant des cellules isolées. La membrane apparaît noire, le noyau violet et le cytoplasme sans coloration ou rose pâle.

Les numérations sont effectuées à la cellule de Nageotte en lumière directe pour les cellules, en contraste de phase pour les noyaux.

Le protocole de fixation et d'inclusion pour les examens submicroscopiques est le suivant : les cellules sont fixées pendant 1 heure à 4° C dans une solution d'acide osmique à 2 % tamponné à *p*H 7,3 (selon Palade, 1952). Le surnageant est éliminé par une centrifugation de 10 min. à environ 100 g_m. Le culot est lavé avec le tampon puis déshydraté progressivement

par l'acétone et finalement inclus dans le vestopal W (Jeager). La polymérisation a lieu à 65° C en 48 heures. Les coupes ultrafines sont faites avec l'ultramicrotome LKB et observées avec le microscope électronique Zeiss EM 9.

VII. — ANALYSE STATISTIQUE

Pour apprécier la signification des différences entre deux moyennes le test de Student a été appliqué.

Les moyennes expérimentales, m, sont accompagnées généralement de leur erreur standard, s_m, calculée selon la formule :

$$s_m = \sqrt{\frac{\Sigma\ (x - m)^2}{n\ (n - 1)}}$$

*
* *

Quelques points de technique particuliers ou transitoires seront précisés au cours de l'exposé des résultats.

DEUXIÈME PARTIE

MÉTHODES PERSONNELLES DE DISPERSION DES CELLULES DU TISSU HÉPATIQUE ET DE LEUR FRACTIONNEMENT

CHAPITRE PREMIER

La dispersion des cellules.

Il y a plus de trente ans que Gruskin (1932) publiait une méthode de préparation de cellules entières par broyage de tissu au mortier. Ce travail et ceux qui suivirent (Beard et Rous, 1934 ; Schneider et Potter, 1943 ; Schrek, 1944 ; Palade et Claude, 1949 ; Kaltenbach, 1954) faisaient tous appel à un procédé mécanique et se dégageaient mal de l'empirisme, en raison sans doute de l'insuffisance des connaissances acquises sur le matériel intercellulaire des tissus animaux. Depuis, le développement de l'Histochimie et l'avènement du microscope électronique ont permis de multiplier les informations à ce sujet sans, précisons-le, apporter la lumière en tous points.

I. — NATURE ET STRUCTURE DU CIMENT INTERCELLULAIRE DES TISSUS ANIMAUX

Il est essentiel de distinguer, dès l'abord, entre les tissus conjonctifs à substance interstitielle abondante et les tissus épithéliaux où la présence d'un ciment intercellulaire est peu importante et, souvent même, contestée. Les hépatocytes appartiennent aux épithéliums et les cellules littorales du tissu hépatique en tant que cellules endothéliales sont considérées comme cellules conjonctives.

A. — Le tissu conjonctif.

Il semble, selon Rinaldini (1958), que la substance interstitielle soit constituée par l'association d'une protéine avec un polysaccharide à hexosamine formant un complexe contenant

plus de 4 % d'hexosamine, c'est-à-dire une mucoprotéine. La protéine serait du collagène (Partridge, 1948) lié non à l'acide hyaluronique, mais plutôt aux esters sulfuriques des acides hexuroniques : mucoïtine sulfate à glucosamine, chondroïtine sulfate à galactosamine (Duran-Reynals, 1942 ; Meyer, 1945). La liaison serait de nature électrostatique, du type protéine amphotère-mucopolysaccharide acide (Loeven, 1955).

Les fibres conjonctives, de nature protéique bien établie, seraient liées soit à l'ensemble du complexe, soit à la fraction glucidique seule. La nature des liens entre les cellules mésenchymateuses et la matrice où elles sont incluses n'est pas connue.

B. — Le tissu épithélial.

Aucun examen submicroscopique, aucune analyse histochimique n'a pu démontrer l'existence d'un matériel intercellulaire. La plupart des auteurs ont exclu la présence d'éléments du tissu conjonctif dans les parenchymes et si certains (Essner, Sato et Belkin, 1954 ; Weiss, 1959 ; Easty et Mutolo, 1960 ; Laws et Stickland, 1961 ; Moscona, 1963) envisagent la possibilité d'une sécrétion protéique maintenant en contact les cellules, ils ne concluent pas que ce revêtement protéique soit situé entre les membranes cellulaires et Laws et Stickland suggèrent qu'il puisse être associé à la membrane cellulaire lipoprotéique.

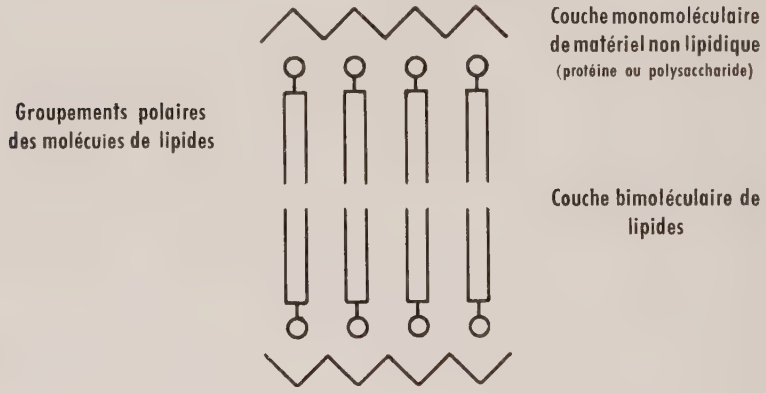
Cette évidence modifie l'étude des relations intercellulaires et la centre sur la nature et la structure des membranes cellulaires.

1° *Définition et structure de la membrane cellulaire.*

La membrane cellulaire se définit comme une barrière à la libre diffusion (Ponder). Ceci n'implique pas la présence d'une membrane superficielle semi-perméable : il suffit qu'il y ait une interface entre la cellule et son environnement. L'ultrastructure superficielle, modification des couches moléculaires externes du cytoplasme au contact du milieu environnant, constitue une interface (Ponder, 1948) ce qui a conduit Bundenberg de Jong (1949) à définir un tissu comme une collection de coacervats. Enfin, Dervichian (1955) a établi qu'un système à deux phases peut constituer une barrière à la libre diffusion sans qu'une troisième phase ou « membrane » soit nécessaire et que les phénomènes de gonflement et d'osmose sont à tort considérés comme associés à la perméabilité, alors que ces phé-

nomènes sont en réalité indépendants de la présence ou de l'absence d'une membrane.

De nombreux modèles de l'ultrastructure superficielle ont été proposés, généralement des lipides et des protéines y sont impliqués : le schéma proposé dès 1935 par Danielli, reposant sur des observations physiologiques et pharmacologiques est très proche de l'illustration reproduite ci-dessous de la structure moléculaire de la membrane de la cellule de Schwann, déduite à partir d'informations morphologiques et physico-chimiques en 1959 par Robertson.



Certains modèles sont purement lipidiques ou font intervenir une structure en mosaïque de plaques protéiques et de palissades lipidiques (Ponder, 1961), d'autres font intervenir le cholestérol (Winkler et Bundenberg de Jong, 1941), ou assimilent l'ultrastructure superficielle à un gigantesque cation ou anion polyvalent (Teorell, 1935). Il est admis, du reste, qu'à des fonctions cellulaires différentes correspondraient des ultrastructures superficielles différentes.

2° *L'adhésivité cellulaire.*

Elle dépend de l'importance relative entre les forces d'attraction et de répulsion. Les premières sont les forces de Van der Waals et assimilées, les attractions électrostatiques entre groupements de charge de signe contraire (en particulier ions carboxyles et cations bivalents) et les ponts H^+ si les surfaces

arrivent au contact. Les secondes, sont les forces électrostatiques entre surfaces chargées de même signe. Les travaux de Curtis (1960) basés sur des propriétés rhéologiques des protéines en couches monomoléculaires montrent qu'il peut exister entre les cellules des adhésions stables, c'est-à-dire un équilibre des forces attractives et répulsives, quand elles sont distantes de 100 à 200 Å.

Les ions Ca^{++} semblent jouer un rôle prédominant, car, en se liant aux carboxyles, ils réduisent la charge négative de la surface ; Abercrombie et coll. (1962) suggèrent même que l'augmentation des charges négatives des cellules tumorales, et par conséquent de leur mobilité électrophorétique, mise en évidence par Ambrose et Easty (1960), Ben-Or et coll. (1960), Barski et Choucroun (1964), pourrait être imputée à une aptitude réduite des membranes de ces cellules à fixer les cations divalents.

3° *Le cas particulier du parenchyme.*

En raison de la structure du lobule hépatique de mammifère, comportant des travées unistratifiées, les hépatocytes adhèrent entre eux par certaines de leurs surfaces et sont libres par d'autres ; la représentation schématique de Elias et Pauly (*fig.* 4) illustre bien les rapports d'un hépatocyte avec, d'une part, ses voisins, d'autre part, les sinus hépatiques.

Le parenchyme hépatique est-il séparé des cellules endothéliales par une membrane basale ? La présence d'une membrane basale continue, telle qu'elle apparaît dans les autres capillaires, n'a été démontrée au microscope électronique que dans le tissu hépatique de Veau (Wood, 1963). Plusieurs auteurs, cependant, ont signalé la présence d'une substance interstitielle dans les espaces péricapillaires ou espaces de Disse : Wassermann (1958), Yamagishi (1959), Steiner (1961), Popper et coll. (1961), Trump et coll. (1962), mais l'accord ne semble pas réalisé à ce sujet.

Par contre, les fibres de réticuline sont décrites unanimement dans les espaces de Disse à côté des microvillosités. Les faisceaux de fibres semblent indenter la surface des hépatocytes (Rüttner et Vogel, 1958 ; Cossel, 1959), et sont apposées plus étroitement aux hépatocytes qu'aux cellules endothéliales (Cossel, 1959) ; ce qui pose le problème de l'ancrage des cellules littorales dans le foie si le revêtement des sinus est discontinu (Novikoff et Essner, 1960) et ce qui cautionne l'existence d'un polysaccharide amorphe dans les espaces péricapillaires.

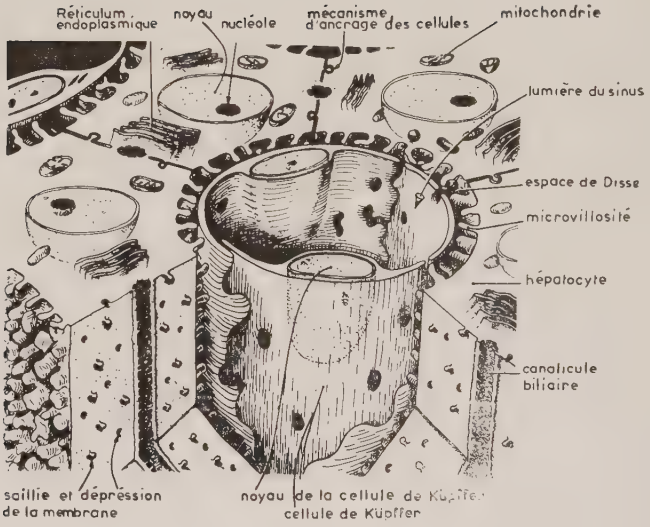


FIG. 4

Ultrastructure du foie de mammifères.
D'après ELIAS et PAULY (1960).

II. — PRINCIPAUX MECANISMES MIS EN ŒUVRE POUR L'ISOLEMENT DES CELLULES. EXAMEN DE LEURS APPLICATIONS.

Les données qui précèdent sur la nature du ciment interstitiel suggèrent que les procédés les plus efficaces pour la désorganisation d'un tissu feront appel, soit à l'action des enzymes hydrolysant les protéines ou les polysaccharides, soit à des procédés modifiant le potentiel de membrane.

Nous nous limiterons aux études qui ont porté sur des tissus adultes. La désagrégation des tissus embryonnaires comme celle de tous les tissus à croissance rapide pose des problèmes particuliers, généralement plus simples à résoudre, car, d'une part, ces tissus contiennent moins de fibres et de collagène insoluble que les tissus adultes et que, d'autre part, la charge négative de surface est plus élevée dans les cellules en voie de prolifération.

A. — Action enzymatique.

Les scléroprotéases telles que la collagénase de Clostridium welchii et l'élastase pancréatique étaient considérées comme peu actives (Rinaldini, 1958). Cependant, en 1957, Hall obtenait avec un bon rendement des cellules conjonctives en utilisant une fraction purifiée de l'élastase pancréatique. Depuis, Walder en 1963 et Rodbell en 1964 avec une collagénase purifiée réussissaient, après incubation prolongée, le premier, l'isolement des cellules de la muqueuse gastrique, le second, celui des cellules du tissu adipeux.

Les mucases, telles que la hyaluronidase testiculaire, échouent à dissocier les tissus même embryonnaires (McIllwain, 1954 ; Moscona, 1958 et essais personnels).

Parmi les protéases et les peptidases, seule la trypsine est employée largement, cathepsines et pepsine étant peu actives à des *p*H physiologiques. Dès 1916, Rous et Jones avaient utilisé l'action protéolytique de la trypsine pour isoler des cellules en culture. C'est encore une méthode de routine utilisée dans les laboratoires de culture de tissus et dans ceux de Virologie. Des cellules viables de rein sont obtenues ainsi par Younger (1954) et Melnick et coll. (1955). Cependant, les cellules libérées de la couche de Malpighi sont très endommagées (Medawar, 1941) et les tentatives de Segard et coll. (1962), comme les nôtres, sur le tissu hépatique sont demeurées infructueuses. Enfin, Scarpinato (1963) a décrit une méthode de trypsinisation du foie par perfusion qui préserve mal les potentialités de la cellule.

B. — Modification du potentiel de membrane.

1° *Par action des agents complexants.*

En 1904, Greeley publiait une description de l'action « liquéfiante » du citrate sur le gel cytoplasmique de Paramecia. Ce principe fut appliqué à la désagrégation de tissus végétaux et, en 1953, Anderson obtenait des cellules isolées, avec un bon rendement, en perfusant le foie avec différents agents complexants. Plus ou moins modifiée, cette technique a fait école : Chevallier (1957), Kalant et Young (1957), Laws et Stickland (1958), Gaja (1959), Jacob et Bhargava (1962), etc., l'ont appliquée. Elle a servi de base à l'élaboration de notre méthode ; nous étudierons plus loin ses caractéristiques et les modifications que

nous y avons apportées, en vue d'améliorer la conservation des cellules isolées par ce procédé.

2° *Par action des ions H^+.*

L'incubation en milieu acide préconisée par Saint-Aubin et Bucher à *p*H 6 (1952), Kamahora et Uenishi à *p*H 4 (1954), Longmuir et Rees à *p*H 5,5 (1956) endommage gravement les cellules et conduit selon nos propres expériences à un très faible rendement. Les travaux de Laws et Stickland (1956) ont confirmé nos résultats.

C. — Action de solutions tamponnées et diluées de saccharose.

Peut-être devrait-on rattacher ce paragraphe au précédent, en tenant compte du pouvoir complexant du saccharose. A l'heure actuelle, le mécanisme de cette action n'est pas élucidé. Quoi qu'il en soit, la méthode de Branster et Morton (1957), développée récemment par Rutter (1961), Berry (1962), Exton (1964), se révèle d'une efficacité certaine.

III. — METHODE PERSONNELLE UTILISEE : DESCRIPTION ET JUSTIFICATION

A. — Choix du principe d'isolement.

Feldman, en 1955, observa que les cellules isolées de Neurula après traitement à la trypsine ne se réagrégeaient plus. Laws et Stickland (1961) renouvelèrent cette expérience en injectant des cellules isolées au sein d'une ascite et conclurent à la perte d'intégrité de la membrane cellulaire par action de la collagénase et de l'élastase. Par contre, dans les deux cas, les auteurs obtenaient une réagrégation à partir de cellules isolées en utilisant un agent complexant le calcium. Par ailleurs, nous pensons qu'il n'est pas certain que les enzymes soient dépourvus d'action intracellulaire. Les facteurs agissant sur les potentiels de membrane nous ont semblé, pour ces raisons, mieux convenir à notre propos.

La méthode décrite par Anderson (1953), qui procède par action d'un agent complexant introduit par perfusion, est particulièrement bien adaptée à la structure trabéculaire du foie. Nous l'avons reprise et modifiée dans le but d'obtenir des

cellules dont les potentialités biochimiques, perdues dans le cas de la technique originale, soient préservées. Outre une perfusion, la méthode comporte une légère désagrégation mécanique du tissu. La structure du lobule hépatique, décrite précédemment, nous permet de penser que *l'élimination des cations divalents libère les surfaces reliant entre elles les cellules d'une travée et que le traitement mécanique intervient pour rompre les liaisons entre la membrane plasmatique des hépatocytes et les fibres conjonctives* (et, peut-être, l'hypothétique substance amorphe de l'espace de Disse).

B. — Etude des différents paramètres.

Reprenant à notre compte l'observation de Jacob et Bhargava (1962), selon laquelle une méthode qui détruit la majorité des cellules ne peut laisser intactes les autres cellules, nous nous sommes attaché à obtenir des suspensions cellulaires avec le rendement le plus élevé possible. Nous définissons le rendement comme le nombre de cellules retrouvées par g de foie. Il a aussi été calculé par la formule :

$$\frac{\text{nombre de cellules isolées}}{\text{nombre de cellules isolées} + 0{,}71 \text{ nombre de noyaux libres}} \text{ (*)} ;$$

ce mode d'expression portant sur la préparation brute est commode, mais il conduit à des valeurs par excès car les noyaux libérés se lysent partiellement en milieu salin.

1° *Composition des milieux.*

Il est essentiel de donner aux cellules isolées un milieu d'environnement aussi voisin que possible du plasma, suppléant au manque d'oxygène et de substrats. Tous les milieux sont préparés à partir de la solution saline équilibrée de Hanks, *p*H 7,4 (oxygénée avant l'emploi) dont la composition par litre est la suivante :

NaCl	8 g
KCl	0,4 g
$MgSO_4$, 7 H_2O	0,2 g
Na_2HPO_4, 2 H_2O	0,135 g
KH_2PO_4	0,1 g
$NaHCO_3$	0,34 g
Glucose	2 g
$CaCl_2$	0,2 g

(*) Le coefficient 0,71 tient compte de la présence de 30 % de cellules binucléées dans le foie de Rat (voir troisième partie).

a) *Milieu de perfusion.* — La perfusion effectuée simplement avec une solution physiologique ne conduit qu'à des rendements de 10 à 12 %. Des essais à partir de différents agents complexants (versène, pyrophosphate, citrate) ont montré que le citrate est le plus efficace à concentration égale. Nous avons substitué au citrate 0,027 M utilisé par Anderson (1953) le citrate de sodium 0,1 M. L'isotonicité des solutions de citrate que nous avons déterminée par l'abaissement du point de congélation est réalisée pour les solutions de citrate de sodium 0,097 M. Cette solution est mélangée en parties égales avec la solution de Hanks dans laquelle aux cations divalents sont substitués des cations monovalents et ajustée à *p*H 7,2.

b) *Milieu de dispersion.* — La mauvaise conservation des cellules en suspension dans un milieu physiologique simple nous a contraint à rechercher une substance colloïdale, dont on puisse augmenter la concentration sans dommage, et qui aurait l'effet protecteur de l'albumine sérique décrit en 1958 par Rinaldini (et Buchsbaum) sur les cellules isolées de cœur de Poulet. Après des essais peu satisfaisants avec la polyvinylpyrrolidone et le sérum de Veau, nous avons adopté pour plusieurs raisons le *Ficoll,* polysaccharide synthétique dont l'usage en Biochimie venait d'être introduit par Holter (1958) :

— Les solutions de Ficoll préparées avec le milieu de Hanks sans calcium constituent d'excellents milieux de dispersion et de conservation des cellules, qui peuvent y séjourner plusieurs heures sans changer d'aspect ;

— La viscosité élevée de ces solutions protège les cellules au moment de la désagrégation mécanique du tissu et, de plus, permet de contrôler les sédimentations ;

— La concentration du Ficoll peut varier sans dommage pour les cellules car ses solutions sont dépourvues d'effet osmotique (son poids moléculaire est environ 400 000) ;

— Enfin, il est neutre, chimiquement inerte et n'interfère pas avec la plupart des déterminations biochimiques.

Les suspensions cellulaires ont donc été préparées dans une solution de Ficoll à 10 % (poids/vol.).

2° *La désagrégation du tissu.*

L'influence du temps d'action du citrate, du procédé d'homogénéisation et de la dilution du tissu a été étudiée systématiquement.

a) *Action du citrate.* — La courbe (*fig.* 5) met en évidence,

d'une part, un retard à l'action du citrate dû vraisemblablement à une pénétration progressive du milieu dans les espaces extracellulaires, d'autre part, un effet nocif à long terme du citrate.

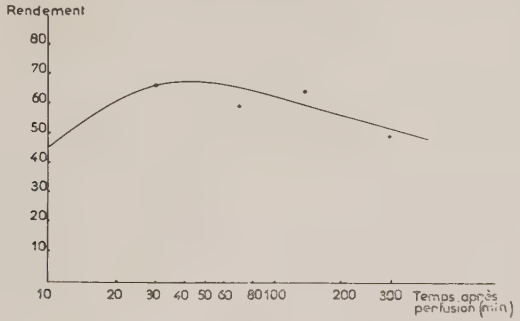


FIG. 5

Action du citrate sur le rendement en cellules en fonction du temps.

Nous dispersons généralement le tissu 30 *min. après la perfusion.* Cependant, lorsqu'il faut que la préparation soit rapide, nous opérons immédiatement, au détriment du rendement. Soulignons que la pénétration intracellulaire du milieu de perfusion et l'oxydation du citrate ne peuvent pas être exclues.

b) *Dispersion mécanique.* — L'appareil du type de celui de Potter-Elvejhem réalisé en plexiglass convient mieux que celui de Latapie ou que les aspirations et refoulements à travers une aiguille fixée sur seringue. Nous avons constaté que le modèle en téflon n'apporte pas d'amélioration sensible, mais il est indispensable que le jeu entre le corps du cylindre et le piston soit ajusté entre *0,8 et 1 mm.* Dans ces conditions, une trentaine de déplacements à la main du piston suffisent généralement pour dilacérer le tissu.

c) L'influence de *la dilution du tissu* n'étant pas sensible de 10 à 50 %, nous avons préparé les *suspensions cellulaires à 10 %* (1 g du foie dans 9 ml de milieu).

3° *Elimination des contaminants.*

La suspension cellulaire brute est purifiée en deux temps :

— Le premier comporte deux filtrations successives, l'une sur toile nylon de 200 μ d'ouverture, l'autre sur tamis en acier

inoxydable de 42 μ ; elles éliminent la plupart des amas de cellules ;

— Le second élimine par centrifugation les débris et les structures des cellules détruites.

L'application de la loi de Stokes à la sédimentation par centrifugation nous permet de calculer les constantes de sédimentation des cellules hépatiques dans nos conditions expérimentales :

$$s = \frac{(d_p - d_m)\ D^2}{18\ \eta}$$

La densité du milieu $d_m = 1{,}036$ et sa viscosité $\eta = 8{,}54$ cp.

La densité moyenne des cellules déterminée sur gradient de densité est : $d_p = 1{,}145$.

Au micromètre oculaire, nous ne trouvons pas de particules cellulaires dont le diamètre moyen soit inférieur à 4 μ. Dans ces conditions, la constante de sédimentation pour la plus petite cellule est : $1{,}3.10^{-8}$ unités C.G.S.

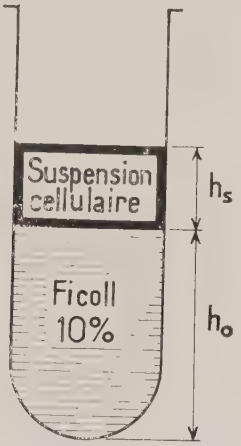
Nos conditions de centrifugation sont les suivantes : centrifugeur international PR 2 équipé avec le rotor 824 pour centrifugation horizontale, distances à l'axe de rotation du fond du tube : 19 cm et de la surface : 13 cm, accélération 1 100 g_m ; dans ces conditions, un temps de centrifugation $t = 8$ min. devrait permettre de sédimenter toutes les cellules. Cependant, l'expérience a montré que t devait être au moins égal à 10 min., les courants de convection et les vibrations particulièrement importantes avec ce type de rotor perturbant les trajectoires des particules.

L'élimination des structures cytoplasmiques des cellules détruites est effectuée par centrifugation dans des tubes de 50 ml, la suspension est déposée sur une couche de Ficoll à 10 % de telle façon que le rapport des hauteurs soit $\frac{h_s}{h_o} = \frac{1}{3}$.

Ce procédé évite la multiplication des lavages, inconvénient des centrifugations différentielles, en créant un retard à la sédimentation des particules contaminantes. Un seul lavage est ici suffisant pour éliminer les substructures libérées, à l'exception des noyaux, ceux-ci sont ensuite sédimentés, en soumettant la suspension à 125 000 g_m pendant 10 min. dans un milieu de Ficoll à 40 % ($d_m = 1{,}19$).

C. — Mode opératoire.

Résumons ce qui précède dans la description de la technique définitivement adoptée (Castagna et Chauveau, 1963).



Ces expériences portent sur des Rats mâles de souche Wistar WAG, de 4 à 10 mois, nourris depuis le sevrage au régime semi-synthétique équilibré de E. Le Breton (1955). Le jeûne précède l'expérience de 15 à 18 heures. Toutes les étapes de la préparation, y compris la perfusion, sont effectuées à 0° — 4° C. Après anesthésie à l'éther, le foie est perfusé *in situ* en moins de 5 min. par la veine sus-hépatique, sous une pression de 1 m d'eau, avec un mélange en parties égales de solution de Hanks sans calcium et de citrate de sodium 0,1 M ; le foie est prélevé, essoré, pesé, grossièrement coupé et introduit dans l'homogénéiseur avec 9 volumes de la solution de Hanks-Ficoll 10 %. Dès que la dispersion est achevée, la suspension est filtrée et centrifugée. Précisons à ce sujet que :

1° La densité de la suspension doit être légèrement abaissée par addition d'environ 5 % de solution de Hanks avant d'être déposée à la surface de la couche de Ficoll 10 % ;

2° L'accélération élevée (1 100 g_m) rend possible la décantation du tube par simple retournement.

CHAPITRE II

Le fractionnement des cellules hépatiques en types et classes cellulaires.

Les procédés classiques de fractionnement des suspensions hétérodispersées reposent sur les propriétés physiques des particules : la constante de sédimentation, le poids spécifique et la densité de charges de surface.

Les méthodes de centrifugation différentielle et de centrifugation zonale qui font intervenir la constante de sédimentation des particules, méthodes classiques pour le fractionnement des structures cellulaires, ont été appliquées aux suspensions de cellules par Kamahora et Uenischi (1954), Saint-Georges et coll. (1954), Chevallier (1957), Rigas et Koler (1961). L'inconvénient présenté par ces méthodes est de ne pas conduire rapidement à des fractions pures.

Les méthodes de séparation par densité sont beaucoup plus sélectives. Elles ont été appliquées avec succès aux suspensions de noyaux (Falzone et coll., 1961 ; Fisher et coll., 1963), de mitochondries (Paigen, 1954 ; Beaufay, 1962 ; Novikoff et coll., 1963), et de microsomes (Palade et Siekevitz, 1956 ; Moule et coll., 1960 ; Rothschild, 1961 ; Hiatt, 1962). Elles peuvent aussi permettre de séparer les cellules de la moelle osseuse (Hilal, 1964) et certains virus (Ozoszlan, 1964).

La distribution à contre-courant repose sur des variations de poids spécifique, de taille et de charge de surface. Walter et coll. (1964) séparent par ce procédé les hématies selon leur âge.

Les analyses électrophorétiques des structures cellulaires (Davenport, 1962) et des cellules tumorales ou en croissance (Ambrose et Easty, 1960 ; Ben-Or et coll., 1960 ; Barski et Choucroun, 1964) ont une résolution élevée, mais ce principe ne conduit pas actuellement à une méthode préparative.

Signalons enfin que Beard et Rous (1934) utilisent la propriété phagocytaire des cellules de Küpffer pour réaliser leur isolement au moyen d'un procédé magnétique.

I. — APPLICATION DES METHODES DE CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE A L'ISOLEMENT DES HEPATOCYTES.

L'écart important existant entre les constantes de sédimentation des hépatocytes 25.10^{-8} unités C.G.S. et des plus grandes cellules non parenchymateuses 10.10^{-8} unités C.G.S. dans le milieu de suspension choisi ($\eta = 8{,}54$ cp) assure une bonne séparation des hépatocytes après un nombre réduit de lavages.

Nous procédons de la façon suivante : *les hépatocytes sont préparés directement à partir de la suspension brute,* les noyaux et autres débris étant de taille égale ou inférieure à celle des cellules non parenchymateuses. Dans les conditions de centrifugation précisées plus haut, le rapport $\frac{h_s}{h_o}$ étant égal à 1, l'accélération = 750 g_m, le temps de centrifugation nécessaire à la sédimentation des hépatocytes déterminé expérimentalement est $t = 90$ sec. Un seul lavage est pratiqué dans les mêmes conditions. Au temps fixé pour une contamination minimale du sédiment, un certain nombre d'hépatocytes restent dans le surnageant.

Bien qu'en quantité négligeable par rapport au nombre des hépatocytes sédimentés, ces hépatocytes « perdus » interdisent de pousser plus avant le fractionnement des cellules non parenchymateuses à partir du surnageant. Le volume occupé par le noyau étant considérablement plus grand dans les cellules non parenchymateuses que dans les hépatocytes, ceci suggérait une différence de densité entre ces cellules.

II. — APPLICATION DES METHODES DE SEDIMENTATION SUR GRADIENT DE DENSITE.

A. — Production d'un gradient de densité.

Les gradients à croissance de densité discontinue créent des interfaces qui s'opposent à la migration des cellules. De plus, le Ficoll étant une substance peu diffusible, il n'est pas possible d'obtenir une croissance continue à partir d'un gradient discontinu, selon la technique de Brakke (1953).

Les divers modèles de mélangeur précédemment décrits pour réaliser des gradients à croissance continue (Behrens, 1938 ; Bock et Ling, 1954 ; Anderson, 1956 ; Kuff et coll., 1956, et

de Duve et coll., 1959) ne peuvent convenir, car ils sont difficiles à fabriquer ou inapplicables à de petits volumes ou impossibles à employer avec des solutions très visqueuses. A ce sujet, précisons que si le Ficoll convient particulièrement en tant que soluté, comme toutes les substances de poids moléculaire élevé, car il ne crée pas de gradient de pression osmotique, la grande viscosité de ses solutions concentrées est un handicap. La mise au point d'un mélangeur spécialement adapté à cette substance a été rendue nécessaire.

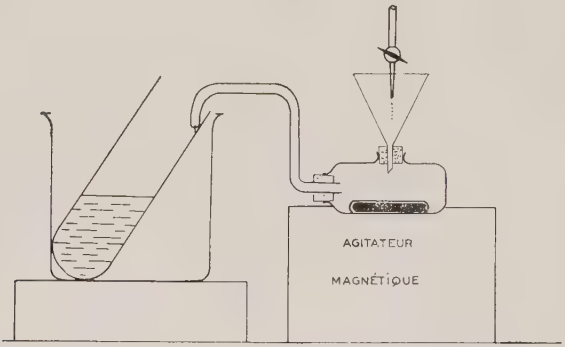


Fig. 6

Le principe de cet appareil, reproduit figure 6, est simple. Il consiste à verser goutte à goutte une solution S_2 dans le mélangeur à volume constant V qui contient au départ une solution S_1. Le mélange s'établit instantanément par agitation, il est recueilli goutte à goutte par un système de siphon.

La concentration dans le mélangeur en fonction du volume v écoulé peut ainsi être calculée :

Soit c_2 la concentration de la solution S_2 et c_1 la concentration initiale de S_1, la variation de la quantité globale Q de Ficoll dans le mélangeur pour un écoulement dv est :

$$dQ = -cdv + c_2dv$$

d'autre part : $dQ = Vdc$

d'où : $Vdc = (c_2 - c)\,av$

cette équation différentielle est intégrée sous la forme suivante :

$$\int_{c_1}^{c} \frac{dc}{c_2 - c} = \int_{o}^{v} \frac{dv}{V}$$

et conduit à l'expression :

$$\log \frac{c - c_2}{c_1 - c_2} = -\frac{v}{V}$$

ou encore : $c = c_2 + (c_1 - c_2)\, e^{-\frac{v}{V}}$ (1)

Quand c_2 est inférieur à c_1, le gradient de concentration décroît exponentiellement (*fig.* 7).

Nous avons vérifié que les densités (d) des solutions de Ficoll sont proportionnelles aux concentrations (c), ce qui nous autorise à écrire l'expression (1) sous la forme suivante :

$$d = d_2 + (d_1 - d_2)\, e^{-\frac{v}{V}} \quad (1')$$

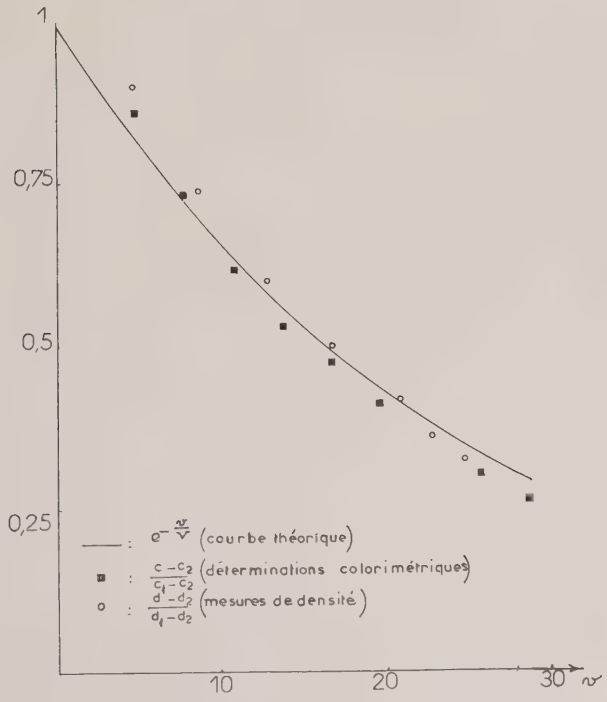


Fig. 7

Vérification expérimentale du gradient.

La vérification expérimentale a porté :

— D'une part, sur des gradients de densité recueillis au fur et à mesure de leur préparation. Dans ce cas, un colorant témoin (bichromate de potassium ou vert de méthyle) était ajouté à la solution dense et sa concentration dans la solution sortant de l'appareil était déterminée colorimétriquement ;

— D'autre part, sur des gradients de densité après centrifugation. Dans ce cas, la densité des fractions recueillies était mesurée directement.

La figure 7 représente la courbe théorique de la fonction $e^{-\frac{v}{V}}$, les points expérimentaux correspondent aux quantités $\frac{c - c_2}{c_1 - c_2}$ déterminées colorimétriquement et aux quantités $\frac{d - d_2}{d_1 - d_2}$ obtenues par la mesure des densités. En effet, d'après les expressions (1) et (1') ces trois quantités doivent être égales pour une même valeur de v.

Cette vérification confirme les résultats théoriques et démontre la permanence du gradient après centrifugation.

La densité en un point donné du gradient peut ainsi être calculée en fonction du volume v écoulé ou de sa distance de ce joint au fond du tube fonction de v.

B. — Séparation par densité des cellules hépatiques.

La suspension de l'ensemble des cellules hépatiques est préparée après injection à l'animal d'argent colloïdal. Ce procédé nous permet de « marquer » les cellules de Küpffer (*fig.* 11) et de suivre ainsi la sédimentation des cellules non parenchymateuses au moyen d'un dosage chimique. Nous avons substitué l'argent colloïdal aux particules de carbone ou d'or utilisées généralement pour provoquer la phagocytose des cellules de Küpffer parce qu'il se prêtait plus facilement à une détermination chimique. En l'absence de données sur les densités respectives des différents types cellulaires, nous identifierons le comportement des cellules de Küpffer avec celui de l'ensemble des cellules non parenchymateuses ; un seul fait peut être évoqué pour justifier cette assimilation : le volume relatif du noyau est du même ordre de grandeur dans les deux cas. Soulignons que la

charge d'argent ne semble pas alourdir sensiblement les cellules de Küpffer.

Le procédé qui consiste à ajouter le matériel au gradient sous forme de suspension dans la solution S_1 du mélangeur nous a paru le plus satisfaisant.

— La densité d_1 de la solution S_1 = 1,175 ;

— La densité d_2 de la solution S_2 = 1,090 ;

— V = 23 ml et v_{final} = 28 ml.

La densité au sommet du gradient est alors de 1,115. La densité d'équilibre est atteinte en trois heures à 63 000 g_m (centrifugeur Spinco, rotor SW 25). Rappelons que dans le cas des centrifugations isopycniques la densité d'équilibre des particules ne donne qu'une idée approchée de la densité réelle de la particule dans son milieu naturel, car elle dépend étroitement du milieu de centrifugation. En effet, les particules réagissent d'une manière qui leur est propre suivant leur perméabilité, leur contenu en substances osmotiquement actives, le poids spécifique et la nature de leurs constituants. Des essais de centrifugation en gradients de saccharose montraient que la place des cellules variait en fonction à la fois de la distribution initiale, du milieu de suspension, du temps de centrifugation, etc., sans que l'équilibre soit jamais atteint, les cellules se détruisant au-delà de d_m = 1,28. Bien que cet effet osmotique n'existe pratiquement pas en gradient de Ficoll, les cellules n'atteignent pas rigoureusement leur équilibre, car leur vitesse de sédimentation tend à s'annuler avec le facteur (d_p — d_m) de l'équation de Stokes. Remarquons enfin que la viscosité du milieu intervient sur cette vitesse différemment selon la position initiale des cellules : accélérant celles qui gagnent le sommet, freinant les autres. Après centrifugation, l'aspect des tubes, qui reflète la distribution des cellules en fonction de la densité, est bien reproductible ; *la concentration en cellules va croissant du sommet du tube vers le niveau inférieur de la zone dense, sans discontinuité.*

Quatre fractions sont généralement collectées par prélèvement avec une pipette automatique à extrémité recourbée :

— La fraction légère (vol. = 12 ml) de densité moyenne égale à 1,122 ;

— La fraction moyenne (vol. = 8 ml) de densité moyenne égale à 1,140 ;

— La fraction lourde (vol. = 6 ml) de densité moyenne égale à 1,158 ;

— Le sédiment de densité égale ou supérieure à 1,175.

Les volumes prélevés ont été déterminés de façon à recueillir approximativement un même nombre de cellules par fraction.

C. — Séparation par densité des hépatocytes.

C'est une variante de la technique précédente qui est appliquée à la suspension d'hépatocytes dont la préparation a été décrite au début de ce chapitre. Ils sont fractionnés sur un gradient de densité identique au précédent au cours d'une centrifugation de deux heures à 63 000 g_m. On ne collecte que trois fractions de densité 1,122, 1,140 et 1,158, car, à partir des suspensions d'hépatocytes, il ne se dépose pas de sédiment.

Après prélèvement et avant d'être soumises aux analyses, ces fractions cellulaires sont diluées de telle sorte que la concentration du Ficoll soit ramenée à environ 10 %.

CHAPITRE III

Contrôle des préparations.

I. — RENDEMENT DE LA METHODE DECRITE

Elle permet de retrouver $7.10^7 \pm 1.10^7$ cellules par g de foie perfusé. Les teneurs en DNA du foie perfusé et de la cellule hépatique moyenne étant connues (chapitre I et III, troisième partie), il a été possible de calculer le nombre de cellules par g de foie perfusé. Nous avons ainsi établi que le rendement moyen de nos expériences était voisin de 40 %.

Le pourcentage de destruction, établi par numération des noyaux et des cellules dans la suspension brute en appliquant la formule :

$$\frac{\text{nombre de noyaux} \times 0{,}71\ (*)}{\text{nombre de cellules} + \text{nombre de noyaux} \times 0{,}71\ (*)}$$

est compris entre 15 et 25 %.

Ces valeurs permettent d'estimer à environ 40 % les amas non dissociés ; c'est essentiellement ce dernier facteur qui est responsable des fluctuations du rendement.

II. — ASPECT MICROSCOPIQUE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

A. — La figure 8 représente la *suspension brute* de l'ensemble des cellules hépatiques avant centrifugation : elle apparaît constituée d'éléments isolés ou groupés par deux ou trois. Le pourcentage de ces amas qui filtrent à travers les mailles de 42 μ n'atteint pas 10 % de l'ensemble des cellules. Nous les assimilons à des cellules isolées quant à leur comportement métabolique, parce qu'elles n'adhèrent entre elles que partiellement et qu'au cours des numérations chaque individu d'un

(*) Ce coefficient tient compte de la présence des cellules binucléées dans le foie.

amas est compté isolément. (Cependant, dans les expériences de migration sur gradient de densité ces petits amas ont été éliminés par filtration sur tamis de 31 μ, ce qui présente l'inconvénient d'augmenter le temps de préparation.)

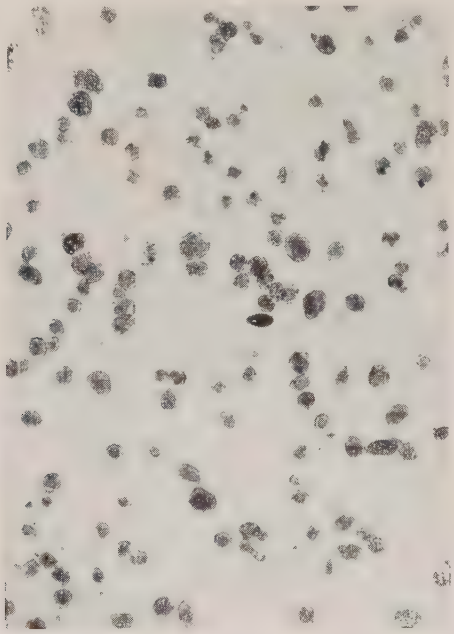


Fig. 8
Suspension cellulaire brute de foie de Rat. Coloration par la Nigrosine. Gross. : × 100.

Nous avons observé que quelques grosses fibres conjonctives sont visibles dans la suspension brute, auxquelles sont parfois fixés des hépatocytes, jamais nous n'y avons vu fixées de cellules de Küpffer. Ce fait pourrait confirmer les observations faites au microscope électronique par Cossel (1959).

La répartition des types cellulaires de cette suspension après centrifugation ne reflète pas exactement celle du tissu. En effet, 80 à 85 % des cellules sont des hépatocytes : les cellules biliaires mal dissociées restent en majorité sur les filtres et les cellules littorales sont en grande partie éliminées avec les noyaux libres au cours de la dernière centrifugation (125 000 g_m).

B. — La *suspension d'hépatocytes* (*fig.* 9) apparaît constituée de cellules de taille et de forme variées, pratiquement pures. Un seul lavage à 750 g_m pendant 90 sec. a permis de réduire à *moins de* 2 % la contamination par les noyaux et les cellules non parenchymateuses de ces préparations.

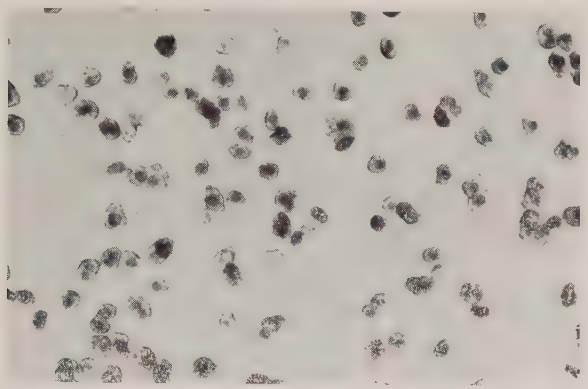


FIG. 9
Suspension purifiée d'hépatocytes. Coloration par la Nigrosine Gross. : × 125.

III. — NATURE DES FRACTIONS ISOLEES SUR GRADIENT DE DENSITE

A. — L'examen cytologique des fractions d'hépatocytes ne révèle pas de différences caractéristiques entre elles : ni aspect, ni taille, ni affinités tinctoriales.

B. — Le fractionnement de la suspension de l'ensemble des cellules hépatiques a été suivi par le dosage de l'ion Ag^+. Nous avons ainsi déterminé la contamination des hépatocytes par les cellules de Küpffer dans les différentes fractions et convenu d'exprimer la proportion des cellules de Küpffer par la quantité d'Ag^+ par mg d'azote.

Les résultats obtenus à l'équilibre sont consignés dans le tableau I.

Ils ont été établis à partir de suspensions non soumises à la centrifugation à 125 000 g_m, pour obtenir les cellules réticulo-endothéliales en quantité notable. Nous remarquons que ces cellules ont des densités qui s'échelonnent entre 1,12 et plus de

1,175 et qu'elles sont essentiellement localisées dans le sédiment avec les noyaux. Il est donc impossible d'obtenir par densité des hépatocytes exempts de cellules de Küpffer. Par contre, *il est possible de préparer par ce procédé des cellules de Küpffer dépourvues d'hépatocytes* en utilisant des solutions de densité égale ou supérieure à 1,175. Les cellules de Küpffer sont alors obtenues en présence de noyaux libres (*fig.* 10). Nous ne sommes pas parvenu à éliminer ce contaminant par les méthodes de centrifugation.

Tableau I

Répartition des cellules de Küpffer en gradient de densité.

Fractions	Densités moyennes	Ag^+ (µg)	$\frac{Ag^+ \text{ (µg)}}{NT \text{ (mg)}}$
I	1,122	17	1
II	1,140	14	0,65
III	1,158	12	0,30
Sédiment	1,175	91	15,2
Suspension initiale		134	3,2

IV. — EXAMENS SUBMICROSCOPIQUES

Ces contrôles portent uniquement sur les hépatocytes. Ils ont été comparés au tissu perfusé (*fig.* 12). A l'examen des micrographies (*fig.* 13 et 14) de l'hépatocyte isolé il apparaît que :

— Le noyau sphérique à contour légèrement festonné présente un nucléole et des granules intranucléaires parfaitement conservés ;

— Les mitochondries sont denses avec des crêtes bien visibles et le réseau endoplasmique, le plus souvent normal, offre un aspect légèrement vésiculeux à la périphérie de la cellule ;

— La membrane est parfois interrompue ; cependant, il n'est pas exclu que ces ruptures puissent être dues au procédé d'inclusion.

La présence des ions Ca^{++} à la concentration de 2.10^{-3} M altère profondément l'ultrastructure des hépatocytes.

Fig. 10

Suspension de cellules de Küpffer marquées par l'argent colloïdal. Présence de noyaux. Examen sans coloration. Gross. : × 175.

En résumé, les méthodes de centrifugation différentielle nous ont permis de préparer des suspensions d'hépatocytes pratiquement exemptes de contamination. Les méthodes de centrifugation faisant intervenir les différences de densité entre particules nous ont permis :

1° de fractionner les hépatocytes en plusieurs classes cellulaires ;

2° d'obtenir des suspensions de cellules de Küpffer dépourvues d'hépatocytes en présence de noyaux.

Nos recherches biochimiques ont porté uniquement sur les hépatocytes, obtenus purs et morphologiquement bien conservés.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE L'HÉPATOCYTE ISOLÉ

CHAPITRE PRELIMINAIRE

La cellule, unité de référence en physiologie cellulaire hépatique.

Depuis longtemps, les biochimistes se sont préoccupés d'exprimer sans ambiguïté la composition d'un tissu, afin de comparer entre elles les variations qu'il subit sous des influences diverses, soit physiologiques, soit pathologiques. Il convenait donc de définir une base de référence aussi invariable que possible. C'est ainsi que l'on a successivement rapporté les données biochimiques (teneurs en constituants ou activités enzymatiques) au poids frais, au poids sec total ou délipidé, aux teneurs en protéines, acides nucléiques et enfin en DNA ; chaque stade représentant un effort pour éliminer de la base de référence des composants de moins en moins variables, et aboutissant par là même à mieux définir la « masse active » du tissu.

L'expression des résultats par rapport au DNA, qui apparaît comme le plus stable de tous les constituants cellulaires (Mandel, 1951 ; Campbell, 1952 ; Thomson et coll., 1953), offre en outre l'avantage d'atteindre les teneurs cellulaires en l'absence de prolifération. En effet, le contenu en DNA d'une cellule somatique est constant et caractéristique d'une espèce (Boivin et coll., 1948). Il est donc possible par ce truchement de rapporter toute teneur ou activité à la cellule elle-même à partir de la teneur en DNA de l'échantillon. Seulement, *ce procédé n'est applicable qu'à un tissu homogène, constitué de cellules diploïdes mononucléées et en l'absence de prolifération.*

Dans les tissus en voie de croissance, le DNA étant aussi une variable ne peut plus servir d'unité de référence pour atteindre les teneurs cellulaires. La détermination de la teneur moyenne en DNA des noyaux isolés du tissu dans les conditions précises de l'expérience permet encore de calculer le nombre de cellules

de l'échantillon. Mais les teneurs ainsi rapportées à la cellule sont peu significatives, car certaines sont à l'état de repos et les autres se trouvent aux différents stades mitotiques ; les variations observées ne sont alors que les variations statistiques du tissu en croissance et non les modifications survenant au niveau de la cellule en voie de division. Notons que, dans ce cas, les méthodes cytospectrophotométriques lèvent dans une certaine mesure ces obstacles.

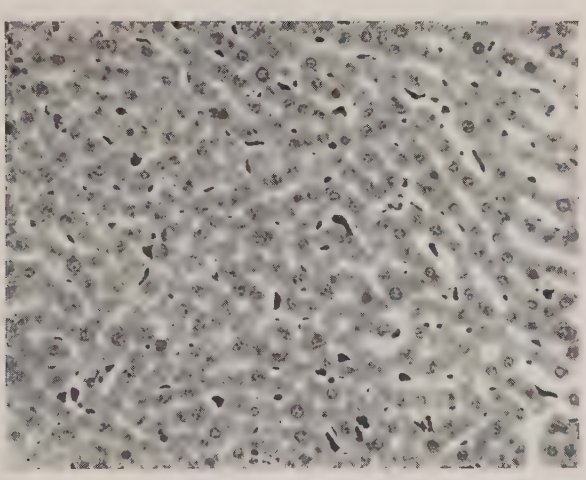


Fig. 11.

Foie perfusé. Noter la dilatation des sinus qui met en évidence la disposition des hépatocytes en travées unicellulaires ; les cellules de Küpffer sont marquées par l'argent colloïdal. Coloration par l'hémalun-éosine. Gross. : × 150.

Le tissu hépatique présente trois particularités qui compliquent considérablement l'interprétation des résultats de l'analyse globale ; *il se compose de plusieurs types cellulaires, il manifeste le phénomène de polyploïdie et certaines de ses cellules possèdent plusieurs noyaux.* Il s'ensuit que le rapport au DNA ne détermine que la composition d'une « cellule hépatique moyenne » ; nous définissons cette dernière comme la cellule résultante de tous les types cellulaires du tissu, compte tenu de leur importance numérique et de leur composition propre. Cette notion de « cellule hépatique moyenne » n'a pas de

réalité propre, elle est éminemment variable en fonction des conditions physiologiques (souche, âge, régime), expérimentales et pathologiques. Et, par voie de conséquence, son contenu en DNA ne peut être considéré comme une caractéristique de l'espèce.

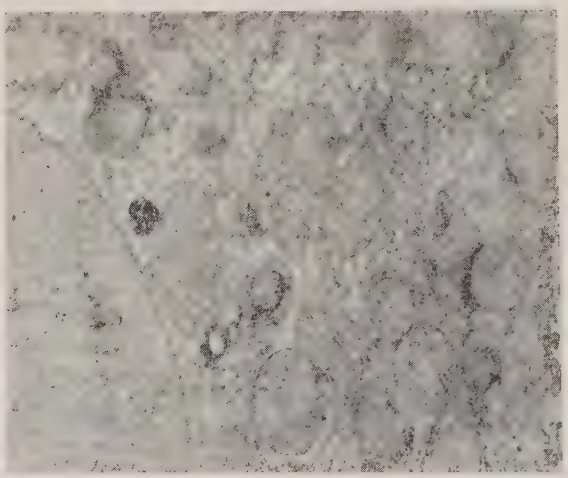


Fig. 12

Foie perfusé. Micrographie électronique. Fixation par OsO_4 à 2 % tamponné selon Palade, inclusion dans le Vestopal. Gross. : × 9 000.

Néanmoins, la plupart des auteurs utilisent ce moyen d'expression pour le foie, affirmant comme Davidson (1960) que « les variations de la teneur moyenne par cellule reflètent l'allure véritable des modifications de composition du tissu », ou l'admettent implicitement. Ceci, qui est vrai dans le cas de la « cellule hépatique moyenne » telle que nous venons de la définir, ne peut tenir compte de l'évolution propre de chacune des populations cellulaires hépatiques. Rappelons, par exemple, que : 1° l'administration de 3'Me DAB multiplie par 100 le volume occupé par les cellules biliaires (Striebich et coll., 1953) ; 2° l'obstruction biliaire entraîne une prolifération exclusive des cellules biliaires ; 3° l'hépatectomie partielle révèle un comportement mitotique particulier des différents types cellulaires quant au déclenchement et au

rythme des mitoses (Harkness, 1952 ; Grisham, 1962 ; Edwards et Koch, 1964). De plus, une donnée globale obtenue à partir d'une population cellulaire peut ne pas refléter une modification survenant au niveau de la cellule. Un exemple est fourni par le dédoublement des hépatocytes binucléés, au cours de la régénération après hépatectomie partielle, qui a été décrit par Beams et King (1942), Sulkin (1943), Bucher et Glinos (1950), Harkness (1952), Saint-Aubin et Bucher (1952) ; il entraîne une variation du nombre des cellules, donc de la composition de la « cellule hépatique moyenne », variation qui échappe à l'analyse globale. Un autre exemple est donné par les observations de Beams et King, 1942 ; Sulkin, 1943 ; Naora, 1964, selon lesquelles une augmentation du degré de ploïdie des cellules apparaît en fin de régénération après hépatectomie partielle ; les synthèses de DNA ne sont donc pas toujours suivies de mitose et par conséquent il ne peut être question d'établir un parallélisme entre l'augmentation de la teneur en DNA total et l'hyperplasie puisque la « cellule hépatique moyenne », c'est-à-dire l'unité de référence, a changé en cours d'expérience.

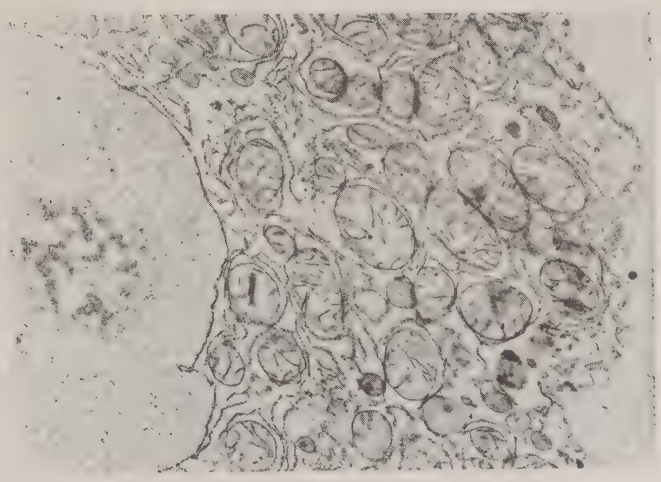


Fig. 13

Hépatocyte isolé. Micrographie électronique. Gross. : × 9 000

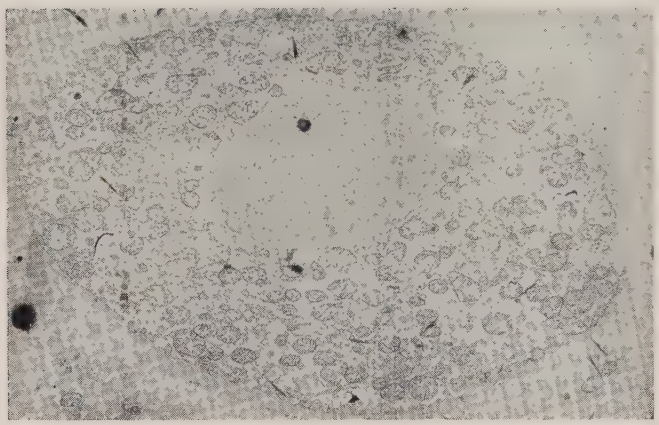


FIG. 14

Hépatocyte isolé. Micrographie électronique. Gross. : × 2 400.

L'analyse biochimique appliquée aux cellules isolées permet une meilleure approche de la constitution cellulaire véritable. Elle pallie, en effet, certaines insuffisances de l'analyse globale du tissu puisque, dans ce cas, la composition est rapportée directement à une cellule issue d'une population de même origine et de même nature. Cependant, en ce qui concerne le parenchyme hépatique proprement dit, lui-même hétérogène, il s'agit encore d'un hépatocyte moyen sensible aux variations éventuelles de la polyploïdie et du nombre de noyaux par cellule.

CHAPITRE PREMIER

Les effets de la perfusion sur le tissu hépatique.

La perfusion constitue le premier temps de la préparation des hépatocytes. Dès ce stade, outre l'élimination du sang dont la présence constitue un facteur d'erreur non négligeable, des modifications éventuelles dues à la perfusion par un milieu complexant le calcium doivent être envisagées. C'est pourquoi, en préalable à l'analyse des hépatocytes isolés, nous avons comparé la composition du tissu perfusé à celle du tissu d'origine.

I. — COMPOSITION DU TISSU HEPATIQUE PERFUSE

Les déterminations portent sur l'homogénat de foie perfusé et sur l'homogénat de foie témoin préparé à partir d'un lobe isolé par ligature avant la perfusion, du même foie. Le milieu d'homogénéisation est la solution de Hanks sans Ca^{++} dans les deux cas.

L'examen de nos valeurs expérimentales rassemblées dans le tableau II révèle le déficit du tissu perfusé en tous les constituants étudiés (acides nucléiques, phospholipides et protéines).

II. — INTERPRETATION DES RESULTATS

Pour interpréter ce phénomène, nous avons envisagé une éventuelle dégradation des constituants et recherché les effets de l'élimination du sang et de la rétention du milieu de perfusion.

A. — Etude de l'autolyse de l'homogénat de tissu perfusé.

La présence dans le sérum d'un inhibiteur de RNAse signalé par Mikhailova et Hadjiolov (1961) suggérait une dégradation accélérée du RNA du foie perfusé.

Nos résultats (tableau III) mettent bien en évidence l'autolyse plus rapide du RNA dans les tissus perfusés (12,5 % par heure à 37° C) que dans le tissu témoin (6,5 % par heure) ; par ailleurs, ils montrent que l'autolyse des autres constituants est lente. Néanmoins, ces phénomènes étant nuls ou négligeables à

TABLEAU II.

Composition du tissu hépatique perfusé.

Constituants (µg/100 mg tissu frais ± σ) (*)	Tissu témoin	Tissu perfusé	Pourcentage du témoin	Pourcentage de rétention
DNA.P	29,2 ± 1,0	22,6 ± 1,5	77,5	22,5
RNA.P	74 ± 2,2	49,8 ± 3,3	67	
PL.P	141 ± 4,5	101 ± 4,1	72	
NP	2666 ± 107	1812 ± 95	68	
NT	3624 ± 77	2402 ± 179	66,3	

(*) σ : déviation standard de la moyenne.

4° C, température à laquelle nous opérons, la dégradation des constituants semble exclue.

B. — MODIFICATIONS ENTRAINÉES PAR L'ÉLIMINATION DU SANG.

Un usage bien établi dans les études biochimiques consiste à négliger pour le Rat le volume sanguin hépatique présent ; il est vrai que les résultats publiés concernant cette évaluation autorisent ce procédé : 1,86 % (KOSTERLITZ, 1947) ; 2,3 - 6 % (HOLZER et coll., 1956) ; 1,5 - 5,2 % (PRAGAY, 1962) chez les Rats décapités et 3,6 - 5,2 % (FENN, 1938) chez les Rats non saignés.

Cependant, la disparité de ces teneurs avec celles (comprises entre 10 et 35 %) attribuées au foie de Souris par KALISS

TABLEAU III — *Stabilité des homogénats de foie.*

	Traitements	DNA.P		PL.P		RNA.P		NP	
		µg/100 mg foie	Pourcentage retrouvé	µg/100 mg foie	Pourcentage retrouvé	µg/100 mg foie	Pourcentage retrouvé	µg/100 mg foie	Pourcentage retrouvé
Foie témoin	Extraction immédiate	25,1	100	149	100	67,8	100	2490	100
	1 h à 37°	24,5	97,6	135,4	91	61,6	90,9	2520	101
	2 h à 37°	24,5	97,6	131,2	88,2	57,9	85,4	2510	101
	4 h à 37°	23,6	94,2	118,7	79,8	49,4	72,9	2410	97
	24 h à 4°	25,6	101,9	144	96,9	68,3	100,6	2592	104
	48 h à 4°	25,2	104,5	144,8	97,3	65,8	97	2950	118
Foie perfusé (*)	Extraction immédiate	15,8	100	74	100	35,4	100	1698	100
	1 h à 37°	14,6	92,5	79,2	107	31	87,5	1582	93
	2 h à 37°	14,8	94	82,6	111	27,8	78,5	1562	92
	4 h à 37°	13,7	86,7	78,6	106	17,3	49	1480	87
	24 h à 4°			79	106,5	35	99	1730	102
	48 h à 4°			77,7	105	34,6	97,5	1780	104,5

(*) Préparé en milieu saccharose 30 %.

et coll. (1950), Storey et coll. (1951) et de Chien par Gibson et coll. (1946), Delorme et coll. (1951) suggérait que les techniques appliquées à cette détermination puissent être mises en cause.

1° *Détermination du contenu sanguin des homogénats de foie.*

La méthode décrite en première partie nous a permis d'évaluer le volume sanguin du foie de Rat non saigné à : 20,01 ± 0,92 ml, soit 21,10 ± 0,97 g de sang pour 100 g de tissu frais et celui du foie de Rat saigné à 8,16 ± 0,56 ml, soit 8,60 ± 0,59 g de sang pour 100 g de tissu frais (tableau IV).

Tableau IV

Contenu sanguin des homogénats de foie de Rat.

	Absorption à 542 mμ		Contenu sanguin des homogénats	
	Sang 0,5 % (*)	Homogénat 2,5 % (*)	En ml/100 g foie	En g/100 g foie (**)
Animaux non saignés	0,534 ± 0,017	0,529 ± 0,029	20,01 ± 0,92	21,10 ± 0,97
Animaux saignés	0,547 ± 0,013	0,227 ± 0,015	8,16 ± 0,56	8,60 ± 0,59

(*) Préparation dans le désoxycholate de sodium à 0,5 %.
(**) Densité du sang de Rat : 1,054.

2° *Influence du sang sur la composition de l'homogénat de foie témoin.*

Le volume sanguin de l'homogénat étant connu, l'analyse du contenu en acides nucléiques, protéines et phospholipides du sang de Rat prélevé par ponction aortique nous permet d'évaluer sa participation dans la composition de l'homogénat de foie témoin. Les résultats rassemblés dans le tableau V montrent que la « contamination » du tissu témoin par le sang n'est quantitativement importante que dans le cas des composés azotés.

TABLEAU V

Participation du sang à la composition du foie témoin.

Constituants	Composition du sang. Teneurs en µg/0,1 ml	Participation du sang (*)	
		En µg/100 mg foie	En pourcentage foie témoin
DNA.P	0,5	0,1	0,3
RNA.P	2,2	0,44	0,5
PL.P	10,7	2,14	1,5
NP	1650	330	12,5
NT	3050	610	17

(*) Calculée pour 20 µl de sang, contenu moyen de 100 mg de foie témoin.

C. — MISE EN ÉVIDENCE D'UNE RÉTENTION DU MILIEU DE PERFUSION PAR LE TISSU PERFUSÉ.

Si la perfusion entraînait le simple remplacement du sang par un volume égal de liquide de perfusion, la concentration en DNA.P ne varierait pas puisque le sang ne contient qu'une quantité négligeable de ce dernier (tableau V) et que la stabilité de ce constituant, dans nos conditions expérimentales, a été établie (tableau III).

Nous attribuons la différence des teneurs en DNA.P entre les tissus témoin et perfusé à la rétention d'un volume excédentaire, et d'ailleurs variable, de milieu de perfusion. Si les quantités respectives de DNA.P pour 100 mg de tissu témoin et perfusé sont égales à u et v, ce volume excédentaire représente donc $\left(1 - \frac{v}{u}\right)$ du volume total du foie perfusé.

La rétention du milieu de perfusion peut être évaluée directement par la mesure des poids secs des homogénats de foie témoin et perfusé, compte tenu de la présence du sang dans le tissu témoin. Dans quelques expériences nous avons comparé poids sec et contenu en DNA.P ; nos résultats reportés dans le tableau VI ont vérifié qu'il existe une bonne concordance entre

le rapport des poids secs et des teneurs en DNA.P des deux homogénats.

Tableau VI

Comparaison entre le poids sec et le contenu en DNA dans les homogénats de foie témoin et perfusé.

DNA.P (µg/100 mg foie frais)	Tissu témoin	26,5 ± 2,73
	Tissu perfusé	22,8 ± 2,40
(*) Poids sec (mg/100 mg foie frais)	Tissu témoin (**)	31,5 ± 0,85
	Tissu hépatique proprement dit	27,1 ± 0,85
	Tissu perfusé	22,9 ± 0,60
$\frac{\text{DNA.P [tissu perfusé]}}{\text{DNA.P [tissu témoin]}}$		0,86 ± 0,03
$\frac{\text{Poids sec [tissu perfusé]}}{\text{Poids sec [tissu témoin]}}$		0,85 ± 0,05

(*) Ces valeurs sont corrigées du poids des sels contenus dans le milieu d'homogénéisation : 8 mg/100 mg foie.

(**) Ces valeurs sont corrigées du poids sec du sang présent. La quantité moyenne de sang étant de 21,1 g et le poids sec du sang étant évalué à 21 %, le poids sec du tissu hépatique proprement dit est égal au poids sec du tissu témoin diminué de 4,4 milligrammes.

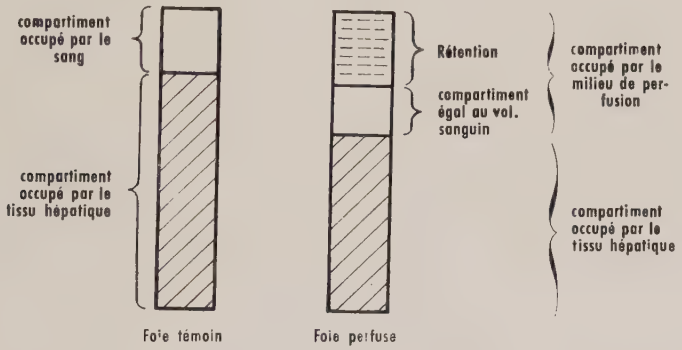
L'importance de cette rétention varie beaucoup, elle dépend des conditions d'essorage du tissu perfusé après prélèvement (ceci implique qu'une comparaison du foie perfusé au foie témoin ne peut être faite valablement qu'à partir d'un nombre suffisant d'expériences).

Nous avons évalué la rétention moyenne du milieu de perfusion à 22,5 %. Ce qui revient à dire que le tissu hépatique présent dans 100 mg de foie témoin ($\simeq$ 80 mg) est contenu dans

$$\frac{100 \times 22,5}{77,5} = 134,5 \text{ mg de foie perfusé.}$$

Le diagramme ci-dessous représente la répartition des diffé-

rents compartiments par *unité de poids* du foie témoin et du foie perfusé.



En conclusion. — Nous avons regroupé dans le tableau VII les valeurs moyennes extraites des tableaux II et V. La composition du tissu hépatique témoin est obtenue par différence entre la composition du foie témoin et la composition du sang présent. Les valeurs théoriques du foie perfusé sont calculées à partir du foie témoin en tenant compte de la présence de 21 % (en poids) de sang et d'une rétention de 22,5 % du milieu de perfusion.

TABLEAU VII

Comparaison du tissu hépatique perfusé avec le tissu hépatique témoin.

Constituants µg/100 mg de tissu frais	Foie témoin			Foie perfusé	
	Teneurs (**) brutes	Participation du sang	Teneurs du tissu hépatique	Teneurs (*) théoriques	Teneurs (**) expérimentales
DNA.P	29,2	0,1	29,1	22,6	22,6
RNA.P	74,0	0,44	73,6	57,1	49,8
PL.P	141	2,14	139,9	107,6	101
NP	2666	330	2336	1800	1812
NT	3624	610	3014	2336	2402

(*) Les valeurs théoriques sont les valeurs du tissu hépatique témoin (colonne 4) multipliées par $\frac{77,5}{100}$ pour tenir compte de la rétention.

(**) Valeurs moyennes du tableau II.

Il apparaît que l'élimination du sang et la rétention du milieu de perfusion rendent bien compte de la composition en DNA et protéines du foie perfusé, mais qu'une diminution de la teneur en RNA et PL d'environ 7 µg par 100 mg de tissu ne peut ainsi s'expliquer. (Les calculs statistiques permettent de considérer ces différences comme significatives.)

A quel phénomène peut-on rattacher cette diminution des PL et du RNA ? Beard et Rous, en 1934, avaient signalé l'élimination de macrophages (leucocytes et cellules de Küpffer) par la perfusion ; pour notre part, nous n'avons pas constaté, dans les perfusats, la présence de cellules de Küpffer après injection de 10 mg d'argent colloïdal à l'animal. Par contre, en comparant la migration sur gradient de saccharose du surnageant mitochondrial des homogénats de foie témoin et perfusé, nous avons pu mettre en évidence la diminution des polysomes au profit des ribosomes dans le foie perfusé. Ce fait peut être interprété comme l'indice d'une certaine dégradation chimique ou enzymatique du RNA au cours de la perfusion.

CHAPITRE II

Données expérimentales concernant l'hépatocyte isolé.

I. — COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DE L'HEPATOCYTE

Les déterminations ont porté sur les teneurs cellulaires en phospholipides, acides nucléiques et protéines.

Le tableau VIII regroupe nos valeurs expérimentales. Nous y avons porté en vue de comparaison la composition d'une « cellule hépatique moyenne » qui sera établie au cours de l'interprétation de ces résultats. Ceux-ci seront confrontés avec les données de l'analyse des structures intracellulaires et avec les tests d'activités enzymatiques avant d'être discutés du point de vue de leur signification physiologique (chapitre III).

Tableau VIII

Compositions de l'hépatocyte isolé et de la cellule hépatique moyenne.

1. *Hépatocyte isolé.* Valeurs expérimentales.

	Nombre expér.	DNA.P	RNA.P	PL.P	NP	NT
Teneurs moyennes en µµg par hépatocyte ..	12	1,58 ± 0,02	3.99 ± 0.15	8,71 ± 0.33	108 ± 4.7	138 ± 8.5

2. *Cellule hépatique moyenne.* Valeurs calculées.

Teneurs en µµg par cellule hépatique moyenne	1,22	2,69	5,46	98	130

II. — COMPOSITION CHIMIQUE DES STRUCTURES INTRACELLULAIRES

Nos résultats sont comparés aux teneurs des structures de la « cellule hépatique moyenne » publiées par Harel et coll. (1957) pour les mitochondries, par Moule et coll. (1960) pour les microsomes et la phase soluble ; enfin, les noyaux isolés d'hépatocytes ont été comparés aux noyaux que nous avons isolés à partir de l'homogénat de foie perfusé. Ils sont exprimés sous forme de rapports ; ce mode d'expression était le seul que nous puissions utiliser dans la mesure où l'obtention quantitative des différentes structures à partir d'une suspension cellulaire donnée n'était pas réalisée (méthode d'obtention décrite en première partie).

L'examen des tableaux IX conduit aux constatations suivantes :

a) Le noyau a un contenu en RNA et en protéines pratiquement normal, alors que celui des phospholipides est nettement plus élevé ;

b) Les mitochondries et les microsomes ne montrent de différences significatives pour aucun des constituants analysés ;

c) La phase soluble apparaît, par contre, très modifiée. Les rapports du RNA et des PL aux protéines sont multipliés par 5, alors que le rapport entre eux de ces deux constituants est normal, ce qui traduit une chute considérable de la teneur en protéines de la phase soluble. Soulignons néanmoins qu'il n'est pas tenu compte, dans les déterminations classiques portant sur la phase soluble utilisée comme référence, de la présence du sang. Or, la fraction soluble est la seule qui soit notablement contaminée par les protéines sériques et l'hémoglobine libérée par hémolyse. Le volume sanguin hépatique variant de 8 à 20 % (tableau IV) selon le mode de sacrifice, l'erreur faite sur l'estimation des protéines à partir d'un homogénat témoin varie donc de 10 à 30 % et plus encore sur l'estimation de l'azote total.

En dépit de cette correction, le déficit en protéines de la phase soluble est considérable. En admettant que les rapports du RNA et des PL aux protéines soient identiques dans les microsomes de l'hépatocyte et de la « cellule hépatique moyenne », nous pouvons approximativement évaluer à 70 % le pourcentage des protéines éliminé de la phase soluble.

TABLEAU IX

Composition des structures isolées d'hépatocytes.

NOYAUX.

	RNA.P (*) / DNA.P	PL.P / DNA.P	NP / DNA.P
Moyennes	0,33	0,29	9,28
$\pm \sigma$	$\pm$ 0,038	$\pm$ 0,025	$\pm$ 1,55
Noyau de la cellule moyenne	0,28	0,17	8,0

PHASE SOLUBLE.

	PL.P / RNA.P	PL.P / NP. 10^{-3}	RNA.P / NP. 10^{-3}
Moyennes	2,40	70,8	28
$\pm \delta$	$\pm$ 0,05	$\pm$ 2,49	$\pm$ 2,02
Phase soluble de la cellule moyenne .	2,41	14,5	6,2

MITOCHONDRIES.

	PL.P / RNA.P	PL.P / NP. 10^{-3}	RNA.P / NP.10^{-3}
Moyennes	6,7	44,4	7,4
$\pm \sigma$	$\pm$ 1,3	$\pm$ 2,7	$\pm$ 1,1
Mitochondries de la cellule moyenne .	2,7 - 7	47,6 - 52	7,2 - 17,2

MICROSOMES.

	PL.P / RNA.P	PL.P / NP. 10^{-3}	RNA.P / NP. 10^{-3}
Moyennes	1,50	107	73,4
$\pm \sigma$	$\pm$ 0,14	$\pm$ 6,9	$\pm$ 2,5
Microsomes de la cellule moyenne .	1,71	111	65

III. — EXAMEN DE QUELQUES ACTIVITES ENZYMATIQUES DE L'HEPATOCYTE

Les mesures d'activités enzymatiques apparaissaient un complément nécessaire aux déterminations précédentes, car elles donnent de la cellule une image plus dynamique que la composition chimique.

Nous avons sélectionné quelques enzymes qui caractérisent chacun par leur localisation principale une des structures intracellulaires du foie.

Nous avons étudié : la glucose 6-phosphatase, exclusivement microsomiale; la phosphatase alcaline insensible au Mg^{++}, à distribution particulaire diffuse mais principalement microsomiale ; la phosphatase alcaline activée par Mg^{++}, appartenant à la phase soluble ; l'adénosine triphosphatase et la succinoxydase qui appartiennent, en partie pour la première et en totalité pour la seconde, aux mitochondries ; la phosphatase acide exclusivement lysosomiale et la lactate déshydrogénase, enzyme associé à la phase soluble.

Nos valeurs expérimentales, consignées dans le tableau X, sont exprimées en micro-unités d'activité par cellule, à l'exception de la succinoxydase dont l'activité est exprimée en $\mu\mu l O_2$ par min. et par cellule. Pour en faciliter l'interprétation, les activités de l'homogénat ont été rapportées à la « cellule hépatique moyenne » à partir du contenu en azote de cette dernière.

Par rapport à la « cellule moyenne », les hépatocytes présentent une égale activité glucose 6-phosphatasique, mais une activité de la phosphatase alcaline insensible au Mg^{++} réduite de 35 %, une activité adénosine triphosphatasique réduite de

40 %, une activité phosphatasique acide et phosphatasique alcaline activée par Mg^{++} réduites de 60 % et une activité succinoxydasique nettement plus élevée. Enfin, l'activité lactate déshydrogénasique subit une chute spectaculaire qui avait déjà été signalée par Henley (1959) et Berry (1962). Dans ce dernier cas, un défaut de perméabilité au substrat ne peut être mis en cause, car la vitesse d'oxydation du $NADH_2$ est identique dans les cellules broyées jusqu'à destruction complète, après leur isolement.

Précisons que ces déterminations ont été effectuées sur des préparations centrifugées à grande vitesse (125 000 g_m pendant 10 min.) et que l'effet nocif des forces centrifuges élevées sur la préservation des protéines sera mis en évidence au chapitre suivant.

CHAPITRE III

Interprétation des résultats.

Pour éclairer l'interprétation des résultats, l'hépatocyte a été comparé à la « cellule hépatique moyenne ». Telle que nous l'avons définie au cours du chapitre préliminaire, la composition de cette « cellule » reflète la composition globale du tissu hépatique proprement dit (la participation du sang étant éliminée).

I. — COMPOSITION THEORIQUE DE LA « CELLULE HEPATIQUE MOYENNE »

Cette composition qui figure dans le tableau VIII a été calculée à partir de la composition du tissu perfusé (tableau II) qui est une donnée expérimentale directe. Ce calcul n'est possible qu'à la condition de connaître la teneur en DNA de la « cellule hépatique moyenne ». Nous avons tenté de déterminer cette valeur de la façon la plus précise possible en nous appuyant sur les données publiées et sur nos résultats personnels.

Teneurs en DNA.P des noyaux de Rat.

Sur la teneur en DNA.P de la cellule somatique diploïde de Rat, déterminée par des méthodes cytophotométriques ou chimiques, les auteurs sont généralement d'accord : 0,58-0,63 µµg, selon Cunningham et coll. (1950) ; 0,61 µµg, Ely et Ross (1951) ; 0,53-0,55 µµg, Harrison (1951) ; 0,65-0,70 µµg, Thomson et coll (1963). Nous avons adopté la valeur moyenne de *0,66 µµg par noyau diploïde.*

Sur la teneur du noyau hépatique moyen les valeurs divergent : 1 µµg, selon Harrison (1951) ; 0,8 µµg, Leuchtenberger et coll. (1952) ; 0,92 µµg, Thomson (1953) ; 0,97-1,36 µµg, Price et coll. (1950) ; 1,45-1,50 µµg, Rose et Schweigert (1952) ; 0,57-0,78 µµg, Cunningham et coll. (1950) ; ce qui n'est pas surprenant, car l'âge, la souche, le régime des animaux diffèrent et que l'influence des méthodes appliquées à cette détermination n'est pas négligeable. Sur nos animaux d'expérience, nous avons évalué cette teneur à *1,032 µµg par noyau.*

Les noyaux étaient isolés par la méthode de Dounce (1943) à l'acide citrique dilué.

Pourcentage de cellules binucléées dans le foie.

Sur coupes de foie, Sulkin (1943) en dénombre 11,7 % chez le Rat adulte, Beams et King (1942) 20 %, et Bucher et Glinos (1950) 9,3 %. Les valeurs obtenues par ce procédé ne sont pas directement significatives et doivent être affectées d'un coefficient tenant compte de l'épaisseur de la coupe. Nous avons adopté *le pourcentage de 30 %* établi par Harrison (1953) sur des cellules isolées, avec lequel les chiffres précédents sont compatibles.

Fréquence des cellules non parenchymateuses.

Le pourcentage des cellules hépatiques autres que les hépatocytes a été évalué *à environ 40 %* par de nombreux auteurs : Abercrombie et Harkness (1951), Stowell (1952), Sibatini et Fukuda (1953), Grant et Rees (1958), Daoust et Cantero (1959).

Bien que Küpffer (1899) et Aterman (1958) aient signalé la présence peu contestable de cellules littorales binucléées, elles sont l'exception.

En tenant compte de toutes ces données et sachant que seuls les hépatocytes sont susceptibles de polyploïdie, nous pouvons effectuer le calcul suivant :

— 100 cellules hépatiques se répartissent entre :
40 cellules non parenchymateuses diploïdes uninucléées
et 60 hépatocytes uni ou binucléés ;

— Ces 60 hépatocytes se partagent eux-mêmes entre :
18 hépatocytes binucléés (30 %) ;
42 hépatocytes uninucléés (70 %) ;
et contiennent donc $18 \times 2 + 42 = 78$ noyaux.

Il en résulte que 100 cellules hépatiques contiennent 118 noyaux ; la teneur en DNA.P d'un noyau hépatique étant 1,032 µµg, ces 100 cellules contiennent $1{,}032 \times 118 = 122$ µµg de DNA.P, d'où : teneur en DNA.P d'une « cellule hépatique moyenne » = *1,22 µµg*.

En outre, 40 cellules non parenchymateuses contenant $40 \times 0{,}66 = 26{,}4$ µµg DNA.P, les 60 hépatocytes ont un contenu en DNA.P de :

$$122 - 26{,}4 = 95{,}6 \text{ µµg}$$

d'où la teneur moyenne en DNA.P d'un hépatocyte :

$$\frac{95,6}{60} = 1,59 \text{ µµg}$$

Enfin, sachant que 60 hépatocytes contiennent 78 noyaux, la teneur moyenne d'un noyau d'hépatocyte est de $1,59 \times \frac{60}{78} = 1,23$ µµg, valeur qui met bien en évidence la polyploïdie de ces noyaux.

Le tissu hépatique perfusé ayant un contenu en DNA.P de 22,6 µg/100 mg, la teneur de la « cellule moyenne » en un constituant donné est obtenue par la formule :

$$\text{teneur par 100 mg foie perfusé} \times \frac{1,22 \times 10^{6}}{22,6}$$

Avant de tenter de dégager certains caractères biochimiques particuliers de l'hépatocyte, nous devons préciser les modifications de composition imputables à l'isolement.

II. — MODIFICATIONS SUBIES PAR L'HEPATOCYTE AU COURS DE SON ISOLEMENT

Nous envisagerons successivement le comportement de chacun des constituants analysés.

1° Acide désoxyribonucléique.

La valeur expérimentale de 1,58 µµg de DNA.P par hépatocyte est en accord avec la valeur théorique (1,59 µµg) que nous avons calculée pour un hépatocyte moyen en tenant compte des divers types cellulaires présents dans le foie et du pourcentage de cellules binucléées.

D'autres données concernant la teneur en DNA.P de l'hépatocyte moyen peuvent être fournies par une autre voie. Elles résultent des déterminations sur coupes du pourcentage des noyaux polyploïdes du foie de Rat suivant Sulkin (1943), Alfert (1954), Himes et coll. (1957), Naora (1964). Les résultats de ces auteurs sont rassemblés dans le tableau X.

En adoptant 0,66 µµg de DNA.P pour la cellule diploïde, le contenu du noyau d'hépatocyte moyen serait pour ces auteurs respectivement : 1,12 et 1,44, 1,15, 1,34, 1,27. En tenant compte du pourcentage moyen de 30 % des cellules binucléées, le con-

tenu en DNA.P de l'hépatocyte moyen doit donc être compris entre 1,46 et 1,87.

Tableau X

Fréquence des classes de noyaux d'hépatocytes.

Auteurs	Age ou poids	Classes nucléaires		
		2 *n*	4 *n*	8 *n*
Alfert	114 jours 1 an	32,5 6	64 81	2,5 12,5
Naora	200 g	8,7	83,4	0
Sulkin	?	12,3	79,2	8,1
Himes	20 semaines	12,5	84	3

Enfin, les examens cytologiques de nos préparations au microscope électronique indiquent que le noyau d'hépatocyte isolé conserve un aspect normal.

Nous pouvons donc conclure que l'hépatocyte isolé conserve intégralement son DNA.

2° Acide ribonucléique et phospholipides.

Les teneurs de l'hépatocyte en ces constituants ne peuvent être étayées par aucune déduction comme dans le cas du DNA. Nous avons vérifié que les structures intracellulaires conservent une composition normale. D'autre part, la libération de structures entières à partir de l'hépatocyte peut être exclue d'après les contrôles effectués au microscope électronique. Nous sommes conduit à admettre que l'hépatocyte n'a perdu ni RNA ni phospholipides dans les stades qui suivent la perfusion du tissu.

3° Protéines totales.

Le déficit des deux tiers de protéines, observé au sein de la phase cytoplasmique soluble, doit entraîner au niveau de l'hépatocyte entier un *déficit de l'ordre de 20 %*.

Striebich et coll. (1953) utilisant la méthode d'analyse cytologique statistique de Chalkley (1943) estiment à 85 % dans le foie de Rat adulte (nourri au régime semi-synthétique Purina

Chow) le *volume* partiel des hépatocytes. La concentration des protéines totales par unité de volume étant relativement constante dans les tissus et les variations certainement négligeables devant la prépondérance dans le foie de la masse des hépatocytes, nous avons pu ainsi évaluer la teneur théorique en protéines d'un hépatocyte moyen à 136 µµg. Cette valeur étant d'environ 20 % supérieure à la valeur expérimentale (108 µµg), il semble que seule la phase soluble de l'hépatocyte subisse une perte en protéines ; quelles en sont les causes ?

a) *Rôle de l'autolyse.*

Bien que nous n'ayons pas observé de dégradation notable à 4° C sur les homogénats, une autolyse des cellules isolées pouvait être envisagée, car, dans ce cas, les structures sont maintenues en place et les co-facteurs ne sont pas dilués. Les résultats de cette étude en fonction du temps sont consignés ci-dessous :

Traitements	DNA.P (pourcentage retrouvé)	RNA.P (pourcentage retrouvé)	PL.P (pourcentage retrouvé)	NP (pourcentage retrouvé)
Extraction immédiate ...	100	100	100	100
2 h à 4° C ..	102	95,8	103	103
2 h à 37° C ..	102	74,8	88	100

Dans nos conditions d'expérience 4° C et même à 37° C, l'autolyse des protéines est nulle. Un déficit en protéines n'a pas été observé dans le tissu perfusé, la dégradation *in situ*, c'est-à-dire au cours de la perfusion des protéines, doit donc être également exclue.

b) *Mise en évidence de l'extrusion de protéines.*

Nous avons pu constater que le contenu en azote des cellules diminuait en fonction de l'augmentation de la vitesse de rotation pour des conditions de sédimentation, par ailleurs équivalentes.

	800 t/min. (73 min.)	1 500 t/min. (20 min.)	2 000 t/min. (11 min.)	3 000 t/min. (5 min.)
Contenu en azote total. %	100 (témoin)	86	83	80

4° Protéines-enzymes.

Il ressort du tableau XI que les enzymes liés à une structure organisée conservent leur activité : glucose 6-phosphatase, succinate déshydrogénase, la fraction de l'adénosine triphosphatase liée aux mitochondries alors que les enzymes présents dans la phase soluble (lactate déshydrogénase et phosphatase alcaline en présence de Mg^{++}) ou au sein d'une structure très labile comme les lysosomes (phosphatase acide) perdent une grande partie de leur activité. La phosphatase alcaline insensible au Mg^{++} dont la distribution est diffuse perdrait 35 % de son activité.

Tableau XI

Activités enzymatiques des hépatocytes isolés.

	Glucose 6-phosphatase	Adénosine triphosphatase	Phosphatase acide	Phosphatase alcaline		Lactate déshydrogénase	Succinoxydase
				avec Mg^{++}	sans Mg^{++}		
Hépatocytes isolés	0,077	0,072	0.0103	0,097	0,084	0,0405	1,60
Nombre de déterminations	(4)	(2)	(4)	(3)	(3)	(3)	(4)
Homogénats de foie témoin ..	0,078	0,123	0.0286	0,264	0,128	0.903	1,13
Hépatocytes homogénat	0,995	0.585	0,435	0,367	0,656	0.045	1,42

Les activités enzymatiques sont généralement exprimées en µµmoles de substrat métabolisées par min. et par cellule ; seule l'activité de la succinoxydase est exprimée en $\mu\mu 10_2$ par min. et par cellule.

Cas particulier de la lactate déshydrogénase.

Les essais précédents montraient une chute de 96 % de l'activité de cet enzyme alors que le déficit de l'ensemble des protéines de la phase soluble ne dépassait pas 65 %. Nous avons recherché s'il s'agissait d'une extrusion préférentielle de la lactate déshydrogénase ou de l'inactivation partielle ou totale de cet enzyme en comparant l'activité spécifique des cellules et des milieux de lavage après centrifugation. En effet, le premier milieu de lavage contient à la fois les structures libérées des cellules détruites, et une part de la phase soluble des cellules entières.

TABLEAU XII

Mise en évidence de l'extrusion de la lactate déshydrogénase.

			Activité (*) par ml d'homogénat ou de suspension (**)	mg N par ml d'homogénat ou de suspension (**)	Activité spécifique (activité par mg N)
Homogénat "témoin"		Structures	24	1,640	14,6
		Phase soluble ..	292	1,671	175
Homogénat "perfusé"		Structures	23,6	1,465	16,1
		Phase soluble ..	190	0,988	192
Suspension cellulaire	1 lavage	Cellules entières.	39,7	1,918	20,6
		Milieu de lavage (***) ..	329	0,853	385
	2 lavages	Cellules entières.	24,1	2,01	12,0
		Milieu de lavage (***) ..	9,8	0,147	66,6

(*) Activité exprimée en µmoles de $NADH_2$ oxydées par min.
(**) Homogénat au 1/10 et suspension au 1/5.
(***) Après élimination des structures.

Les résultats du tableau XII montrent :

1° Que 85 % de l'activité lactate déshydrogénase des suspensions se retrouvent dès la première centrifugation dans le milieu de lavage ;

2° Que l'activité spécifique du milieu de lavage est nettement supérieure à celle du tissu perfusé.

Ces deux faits témoignent d'une *extrusion privilégiée* de la lactate déshydrogénase par rapport aux autres protéines de la phase soluble.

Le comportement particulier de cet enzyme est à rapprocher de celui de l'aldolase, pour lequel la perméabilité est étroitement dépendante du potentiel de membrane, selon Shanes (1960) et particulièrement du contenu en calcium du tissu.

En conclusion, les dommages provoqués par l'isolement n'apparaissent pas très sévères en ce qui concerne la composition biochimique de l'hépatocyte, ils portent essentiellement sur les protéines de la phase soluble, et ce, dans des proportions variables selon la protéine considérée. A ce propos, rappelons que le foie synthétise une grande partie des protéines du sang : totalité de la sérumalbumine (Madden et Whipple, 1940) et des α-globulines, une partie des β-globulines (Miller et Bale, 1954) et qu'il joue également un rôle important dans le stockage des protéines plasmatiques. Un rapprochement peut être envisagé entre ce rôle physiologique de l'hépatocyte et l'extrusion rapide de certaines protéines favorisée par la modification du potentiel de membrane qu'entraîne l'élimination des ions Ca^{++}. Les différences de comportement des protéines solubles selon leur nature pourraient trouver ainsi une explication satisfaisante. Cette hypothèse reste évidemment à vérifier.

III. — PARTICULARITES DE COMPOSITION DES HEPATOCYTES

La comparaison de l'hépatocyte à la « cellule hépatique moyenne », à laquelle ce dernier contribue pour une large part, ne peut donner qu'une image estompée de ses caractéristiques propres. Par contre, ces dernières apparaîtront beaucoup plus nettement par opposition avec la cellule non parenchymateuse.

Dans le tableau XIII, les rapports entre eux des constituants étudiés de la « cellule hépatique moyenne », de l'hépatocyte et de la cellule non parenchymateuse sont comparés aux valeurs de ces rapports obtenus de façon classique à partir du foie total.

Tableau XIII

Rapports de quelques constituants dans les différents types de cellules hépatiques.

	RNA.P / DNA.P	PL.P / DNA.P	NP / DNA.P	NT / DNA.P	PL.P / RNA.P
Foie total non perfusé.	2,53	4,86	91	124	1,92
Cellule hépatique moyenne	2,2	4,47	80	107	2,03
Hépatocyte isolé	2,52	5,50	68	87	2,18
Cellule non parenchymateuse (*)	1,33	1,59	—	—	1,20

(*) Composition obtenue par différence entre la cellule hépatique moyenne et l'hépatocyte isolé.

1° *Rapport nucléoplasmique.* — Celui-ci, qui peut être assimilé au rapport RNA.P/DNA.P, apparaît nettement plus élevé dans les hépatocytes que dans les cellules non parenchymateuses, ce qui ne peut surprendre, étant donné l'importance des synthèses dont l'hépatocyte est le site.

2° *Phospholipides et protéines.* — La richesse des hépatocytes en phospholipides est manifeste d'après le rapport PL.P/DNA.P.

Cette *concentration élevée des phospholipides et du RNA dans les hépatocytes* traduit l'abondance du réseau endoplasmique de ces cellules. A l'inverse, les cellules non parenchymateuses sont pauvres en phospholipides ; ce fait est corroboré par les examens cytologiques de Rouiller et Jezequel (1963), qui soulignent la rareté de l'ergastoplasme dans ces cellules.

La perte partielle des constituants protéiques ne permet pas actuellement d'apporter des précisions à leur sujet.

3° Le *noyau de l'hépatocyte* isolé se caractérise par un rapport élevé des phospholipides au DNA.

4° En ce qui concerne les *activités enzymatiques,* des conclusions ne peuvent être établies que pour les enzymes liés à des structures organisées.

La succinoxydase semble prédominer dans les hépatocytes ; il en sera discuté à propos de l'oxydation du succinate dans la quatrième partie de cet exposé.

La glucose 6-phosphatase présente une distribution homogène dans les différentes cellules hépatiques alors que la phosphatase alcaline insensible aux ions Mg^{++} semble plus abondante dans les cellules non parenchymateuses.

La faible activité constatée pour un enzyme tel que la phosphatase acide ne permet pas de conclure qu'il appartient préférentiellement aux cellules non parenchymateuses, comme les travaux de Novikoff et Essner (1960) le suggéraient, en raison de l'élimination incontestable d'une part importante des protéines de la phase soluble.

Le bilan de la composition de l'hépatocyte isolé étant dressé, nous avons entrepris de contrôler ses activités fonctionnelles.

QUATRIÈME PARTIE

ACTIVITÉS MÉTABOLIQUES DE L'HÉPATOCYTE ISOLÉ

Nous avons réalisé un série de recherches sur l'hépatocyte en tant que cellule isolée afin de contrôler le maintien et de mesurer le niveau d'activité des principales fonctions métaboliques impliquant l'intégrité de multi-systèmes enzymatiques et non pas simplement la présence d'un enzyme donné considéré isolément comme nous l'avions fait dans la troisième partie du mémoire. Ces études, n'ayant pour but que de contrôler l'intégrité du « chimisme cellulaire » par rapport à celle des autres matériaux biologiques utilisés en Physiologie cellulaire, n'ont fait l'objet que de développements limités. Nous avons examiné, d'une part, la glycolyse et la respiration, d'autre part, l'activité des synthèses protéique et ribonucléique.

La glycolyse et la respiration sont les processus libérant et transformant l'énergie chimique potentielle des nutriments dits énergétiques. Tous les processus endergoniques, caractérisant la vie, nécessitent que leur soit associée une réaction libérant l'énergie à un niveau adapté ; la variation de l'énergie libre du couplage étant négative. Les principales activités endergoniques : *biosynthèses, travail mécanique* (non seulement contraction musculaire, mais tous les mouvements intracellulaires du cytoplasme, des mitochondries, etc.), *transport actif* des substances organiques ou inorganiques contre les gradients de concentration au travers des diverses membranes, *conduction* d'influx nerveux, etc., toutes ces activités nécessitent la présence de molécules du type de l'ATP. L'ATP se forme au cours de la glycolyse et de la respiration par transfert de l'énergie sur l'ADP en présence de phosphate inorganique. L'énergie libérée ultérieurement lors de l'hydrolyse de la liaison $P\sim$ permet les couplages nécessaires aux travaux cellulaires, en raison du ΔF de la réaction. L'intermédiaire pour les échanges d'énergie, ce sont donc les liaisons $P\sim$.

La Physiologie cellulaire a permis au cours des trente dernières années de localiser dans le noyau, les structures intracyto-

plasmiques ou la phase soluble du cytoplasme les diverses activités métaboliques : *glycolyse* dans le noyau et principalement le cytoplasme, aucune glycolyse dans les mitochondries.

Respiration, dans la mitochondrie — cycle tricarboxylique et transfert des électrons jusqu'à l'oxygène — ; un rôle capital revenant à la membrane mitochondriale, locus des enzymes impliqués dans les oxydations phosphorylantes.

Synthèse protéique au niveau des formations ribosomiales, tant nucléaires que cytoplasmiques. L'activité synthétisante est plus grande pour les ribosomes liés aux membranes ergastoplasmiques que pour les ribosomes libres. La synthèse protéique aurait également lieu dans les mitochondries, où elle serait localisée sur les membranes de cette structure ; cette synthèse concernerait les protéines des membranes elles-mêmes. L'activité du métabolisme cellulaire se répercute fatalement sur la synthèse des protéines-enzymes.

Synthèse des acides nucléiques. A partir des acquisitions actuelles, Smellie (1963) considère que les différents RNA cellulaires sont synthétisés dans le noyau sur une matrice de DNA par la RNA-polymérase, ces RNA (RNA solubles ou de transfert, RNA messagers, RNA ribosomiaux) migrent ensuite vers le cytoplasme par un mécanisme encore inconnu.

Ces quelques précisions simplifieront, pensons-nous, la discussion des résultats expérimentaux que nous avons rassemblés dans les deux chapitres de cette partie.

CHAPITRE PREMIER

Respiration et glycolyse.

Il pourrait sembler à priori plus logique de relater en premier lieu les observations concernant la glycolyse, mais nous avons préféré examiner comparativement la respiration endogène, puis celle en présence d'un certain nombre de substrats exogènes dont le glucose. L'oxydation du glucose étant étudiée nous avons fait quelques mesures de glycolyse aérobie.

Dans tous les cas, les résultats obtenus sur les hépatocytes isolés ont été comparés à ceux obtenus sur l'homogénat et parfois à ceux fournis par les coupes de tissu.

I. — RESPIRATION

A. — Respiration endogène.

C'est la consommation d'oxygène des divers matériaux biologiques mesurés au Warburg, les seuls substrats d'oxydation étant ceux présents dans les préparations. Dans ces expériences nous n'avons ajouté aucun co-enzyme ou activateur aux milieux d'incubation afin de connaitre les aptitudes des cellules isolées telles que nous les livre notre méthode.

Les hépatocytes isolés en présence de Ca^{++} à la concentration de 1 mM présentent au microscope électronique, nous l'avons dit, une morphologie profondément altérée ; c'est pourquoi nous avons voulu comparer les résultats obtenus pour l'activité respiratoire en présence ou absence d'ions Ca^{++} dans le milieu.

1° *En présence d'ions* Ca^{++}.

A la fin de leur préparation les cellules sont reprises dans un milieu de Hanks complet, c'est-à-dire contenant des ions Ca^{++} et Mg^{++}. Ce même milieu a été utilisé pour les homogénats et coupes.

Voici les valeurs obtenues à 30° C, pour une durée d'expérience de 20 min., les résultats étant rapportés au mg d'azote des préparations :

Homogénat de foie témoin : 6,15 µl d'O_2 .. 6 expériences
Homogénat de foie perfusé : 7,34 µl d'O_2 .. —
Suspension d'hépatocytes : 4,66 µl d'O_2 ... —
Coupes de tissu : 4,52 µl d'O_2 ..... 3 expériences

2° *En absence d'ions* Ca^{++}.

Les consommations d'O_2 à 30° C pendant 20 min., obtenues dans le milieu de Hanks sans calcium, sont les suivantes :

Homogénat de foie témoin : 11,6 µl d'O_2 .. 16 expériences
Homogénat de foie perfusé : 15,1 µl d'O_2 .. —
Suspension d'hépatocytes : 7,6 µl d'O_2 .... —
Coupes de tissu : 7,7 µl d'O_2 ..... 3 expériences

Ces résultats sont résumés dans le diagramme de la figure 15.

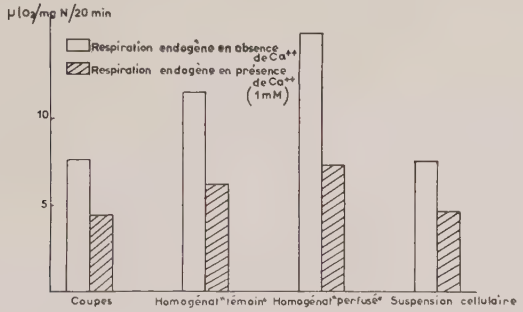


Fig. 15
Inhibition de la respiration endogène par les ions Ca^{++}.

On voit donc que l'ion Ca^{++} inhibait considérablement la respiration des diverses préparations. Cet effet sur les homogénats a déjà été signalé par Elliott et Libet (1942) ; Potter (1947) précisait que dès la concentration 0,2 mM de cet ion, il y avait une très importante inhibition de l'oxydation de l'oxalacétate alors que celle du succinate n'était pas modifiée.

C'est donc dans *le milieu sans* Ca^{++} que nous avons fait toutes les recherches qui suivent.

La cinétique de la consommation endogène d'oxygène par les hépatocytes montre qu'elle n'est linéaire que durant 20 min. (*fig.* 16). Il en va de même pour les homogénats.

En ce qui concerne les activités respiratoires endogènes des

quatre préparations, elles se classent dans le même ordre pour les deux milieux. Si l'activité de l'homogénat de foie perfusé est supérieure à celle du témoin, c'est en raison des protéines sanguines présentes qui majorent d'autant le contenu en azote de ce dernier.

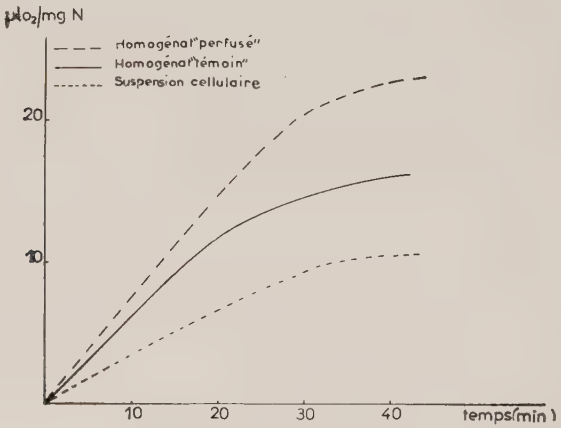


Fig. 16
Cinétique de la respiration endogène.

Par contre, si on tient compte du déficit de la teneur en azote des suspensions cellulaires, leur respiration endogène n'est que la *moitié* de celle de l'homogénat « perfusé » ; faut-il en conclure à une teneur plus faible du multi-système enzymatique de la respiration ? Nous ne le pensons pas, car si on soumet les hépatocytes à deux lavages, le $Q\,O_2$ n'est plus que de 3 µl par mg d'azote en 20 min. en absence de Ca^{++}. Nous pensons que les substrats endogènes et co-facteurs solubles passent au travers de la membrane cellulaire dont la perméabilité est augmentée, car nous allons voir que dans ce même milieu les consommations d'oxygène sont importantes en présence de substrats exogènes.

B. — Respiration en présence de substrats exogènes.

1° *Intermédiaires et précurseurs du cycle de Krebs (I.C.K.).*

Nos essais sont effectués avec les sels de sodium des acides pyruvique, lactique, acétique, citrique et succinique. L'effet de l'oxydation de ces substrats sur la respiration, à différentes

concentrations, fait l'objet du tableau XIV. Nous y avons exprimé l'intensité des effets sur le $Q O_2$ du substrat introduit par le rapport des valeurs observées en sa présence à celle de la respiration endogène.

Ce tableau met en évidence les faits suivants :

a) Les *acides lactique et acétique* augmentent les consommations d'oxygène dans les mêmes proportions pour les cellules et l'homogénat de foie perfusé ;

b) L'*acide pyruvique* à la concentration de 20 mM est oxydé plus rapidement dans les suspensions, rétablissant ainsi le niveau des oxydations observé dans les homogénats ;

c) L'*acide citrique* ne stimule les oxydations des homogénats que pour des concentrations inférieures à 10 mM, pour lesquelles les suspensions manifestent une activité respiratoire considérable. L'effet inhibiteur du citrate, qui apparaît déjà nettement avec une concentration de 20 mM dans les homogénats, ne se manifeste qu'à partir de 100 mM dans les suspensions. Soulignons que cette intense oxydation du citrate aux faibles concentrations doit conduire à n'accepter qu'avec réserve le sens de l'expression « respiration endogène » en ce qui concerne les hépatocytes isolés ;

d) L'*acide succinique* 100 mM décuple la consommation d'oxygène des suspensions, alors que celle des homogénats n'est que doublée. L'homogénat de foie perfusé, par contre, est moins activement stimulé que l'homogénat de foie témoin ; mais l'addition de Ca^{++} au milieu d'incubation, à la concentration de 1 mM, rétablit le même niveau d'oxydation dans les deux homogénats. Dans les suspensions cellulaires, une addition analogue de Ca^{++} modifie peu l'effet du succinate ; le $Q O_2$ en présence de succinate est alors égal à celui des homogénats ; mais si on ajoute du cytochrome *c* dans le milieu, on rétablit un niveau d'oxydation plus élevé dans les cellules que dans les homogénats. Le cytochrome *c* serait le facteur limitant en présence de Ca^{++}. Nous ajouterons une remarque faite au cours de l'expérimentation : c'est que, en présence de Ca^{++}, les coupes de foie oxydent le succinate plus lentement que les homogénats ($Q O_2 = 42$). Nous pensons que, les ions Ca^{++} stimulant l'activité de l'adénosine triphosphatase, la chute de la teneur en ATP du milieu intracellulaire retentirait sur le transport actif du substrat au travers de la membrane des cellules intactes dans les coupes. Cet effet n'y étant pas observé, il est suggéré que la perméabilité aux molécules de succinate est modifiée dans les cellules isolées.

TABLEAU XIV — *Influence sur les consommations d'oxygène de quelques intermédiaires et précurseurs du cycle de Krebs.*

	Nombre d'expériences	Concentration des substrats	$Q O_2$ substrat/$Q O_2$ endogène		
			Homogénat de foie témoin	Homogénat de foie perfusé	Suspension cellulaire
Pyruvate	8	10 mM	1,45	1,25	1,96
		20 mM	1,44	1,46	2,70
Lactate	3	20 mM	—	1,31	1,23
		50 mM	—	1,85	1,69
Acétate	2	20 mM	—	1,31	1,23
Citrate	6	1,8 mM	1,23	1,22	4,95
		7,5 mM	0,98	1,25	3,07
		20 mM	0,91	—	3,25
		50 mM	0,82	0,68	2,51
		100 mM	0,81	0,68	0,90
Succinate	6	20 mM	2,15	1,30	6,8
		50 m M	1,92	1,20	9,1
		100 mM	2,20	1,78	9,8

Milieu d'incubation : solution de Hanks sans Ca^{++} ; durée d'incubation : 20 min. à 30° C.

D'autres informations nous ont été fournies par la mesure de l'*activité succinoxydasique* dans les trois préparations. Les cellules manifestent une activité supérieure à celle des homogénats et l'homogénat de foie perfusé se montre plus actif que le témoin ; le fait persiste même en tenant compte de l'erreur faite sur la détermination de l'azote. On est conduit à attribuer l'effet du succinate dans le cas des cellules à une augmentation de l'activité de la succinoxydase en rapport avec l'élimination du Ca^{++}. Schneider et Potter (1943), pour tenter d'expliquer l'activation de la succinoxydase de l'homogénat (témoin) par les ions Ca^{++} qu'ils constataient, avaient suggéré que ces ions accélérant la dégradation du NAD entraînaient la diminution de la formation d'oxalacétate qui est un inhibiteur de la succinate déshydrogénase. Or, en 1961, Gibbons et Rienits ont montré que dans les cellules qu'ils isolent il reste peu de co-enzyme I ; il est donc possible d'admettre que la chute du NAD dans les cellules limite la formation de l'oxalacétate inhibiteur de la succinate déshydrogénase comme le proposaient Schneider et Potter.

Le diagramme de la figure 17 regroupe nos résultats expérimentaux.

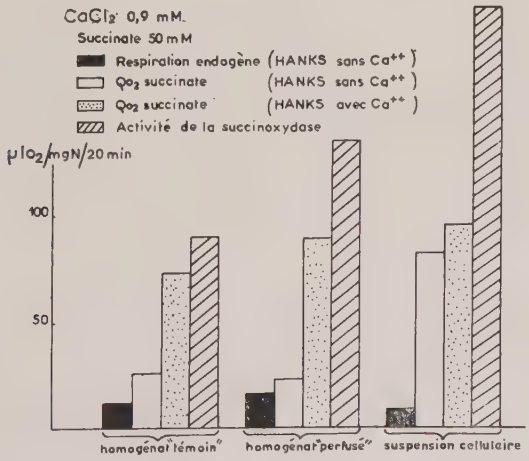


Fig. 17
Effet du succinate sur la vitesse des oxydations.

2° *Respiration en présence d'acides gras.*

Nous avons utilisé dans nos expériences le butyrate, le

caprylate et le palmitate de sodium. Le tableau ci-dessous montre que l'oxydation a lieu pour les trois substrats qui augmentent, dans les homogénats et les hépatocytes, le $Q O_2$; les différences observées entre les préparations biologiques ne sont pas significatives, car elles portent sur un petit nombre d'expériences (3). Rappelons à ce sujet qu'il serait erroné de considérer que l'oxydation d'un substrat est mesurée par l'augmentation du $Q O_2$ endogène, particulièrement dans le cas des acides gras ; les expériences anciennes (1931) de F. Dickens et celles, plus récentes, de L. Harel (1959) montrent qu'il y a substitution aux métabolites endogènes.

Substrats	$Q O_2$ substrat/$Q O_2$ endogène		
	Homogénat de foie témoin	Homogénat de foie perfusé	Suspension cellulaire
Butyrate 2 mM.	1,30	—	1,43
Caprylate 4 mM.	1,75	1,96	1,88
Palmitate 4 mM.	1,68	1,42	1,72

3° *Respiration en présence de glucose ou dérivés.*

Nous ne ferons que mentionner ici les expériences qui mettent en évidence, dans le cas des homogénats ou des cellules, l'oxydation de l'éthanol. Nous avons trouvé que les rapports $\frac{Q O_2 \text{ éthanol}}{Q O_2 \text{ endogène}}$ étaient compris entre 1,2 et 1,5. Nous faisions varier les concentrations de l'alcool entre 1 et 25 mM.

C'est le glucose qui a fait l'objet de ces recherches, tant pour déterminer le niveau de la glycolyse dans les hépatocytes que celui des $Q O_2$; c'est-à-dire pour l'étude du métabolisme de ce substrat par la voie d'Embden-Meyerhoff et le cycle de Krebs.

Examinons tout d'abord les phénomènes liés à la respiration, mesurés par les consommations d'oxygène. Dans le milieu de Hanks (sans Ca^{++}), ainsi qu'il fallait s'y attendre, nous obtenons une augmentation faible ou nulle du $Q O_2$ des homogénats et une diminution nette de la respiration endogène des cellules. Mais si, à ce milieu, on ajoute par fiole 0,5 mM d'ATP

et 0,3 mM de NAD, alors on constate une *active oxydation du glucose* et également du *glucose 6-phosphate*.

En ce qui concerne l'influence des concentrations de glucose, elle est différente sur les homogénats et sur les cellules (tableau ci-dessous).

	Homogénat de foie perfusé	Suspension cellulaire
Influence des co-facteurs ajoutés : $\frac{Q\,O_2\ ATP + NAD}{Q\,O_2\ endogène}$	1,43	1,15
$\frac{Q\,O_2\ glucose\ 15\ mM}{Q\,O_2\ ATP + NAD}$	1,27	1,07
$\frac{Q\,O_2\ glucose\ 45\ mM}{Q\,O_2\ ATP + NAD}$	1,19	1,78
$\frac{Q\,O_2\ glucose\ 6\text{-}P\ 22{,}5\ mM}{Q\,O_2\ ATP + NAD}$	1,12	1,23

On voit que l'augmentation de la respiration est plus importante sous l'influence du mélange ATP + NAD dans le cas de l'homogénat de foie perfusé que dans celui de la suspension cellulaire, ceci pour une concentration faible du substrat. Au contraire, l'activité respiratoire des cellules isolées est très augmentée lorsque la concentration en glucose atteint 45 mM alors que cette concentration abaisse le $Q\,O_2$ de l'homogénat de foie perfusé. Enfin, l'oxydation du glucose 6-phosphate a un effet plus important sur le $Q\,O_2$ dans suspensions cellulaires à la concentration de 22,5 mM.

En somme, l'addition de molécules riches en énergie et de co-enzyme I est indispensable à l'oxydation du glucose dans les cellules comme dans les homogénats. Nous pensons que les molécules d'ATP interviennent dans la réaction hexokinasique, mais il est possible que ces molécules jouent également un rôle dans le transport actif au travers des membranes mitochondriales des produits de la glycolyse.

II. — GLYCOLYSE AEROBIE

Le fait qu'en présence d'ATP et NAD la respiration se trouve augmentée montre que le métabolisme du glucose via les réactions de Embden-Meyerhoff jusqu'au stade de l'équilibre acide lactique + NAD $\Longleftrightarrow$ $NADH_2$ + acide pyruvique se produit dans les cellules libres comme dans le tissu hépatique normal. La production d'acide lactique, mesurée par dosage direct de celui-ci, et non indirectement par le CO_2, a été l'objet de quelques expériences portant sur les deux homogénats et la suspension d'hépatocytes. Dans cette suspension la production d'acide lactique est le tiers de celle observée dans les homogénats : les moyennes obtenues en 20 min. à 37° C sont de :

195 µg d'acide lactique par mg d'azote pour l'homogénat de foie témoin ;

198,5 µg d'acide lactique par mg d'azote pour l'homogénat de foie perfusé ;

et 58,5 µg d'acide lactique par mg d'azote pour la suspension cellulaire.

Nous avions montré que l'activité lactate déshydrogénasique des hépatocytes mesurée directement n'est que 5 % de celle des homogénats, cependant qu'en présence de 50 mM de lactate les $Q\,O_2$ de ces cellules est augmenté comme celui de l'homogénat ; il faut donc en conclure que ce n'est pas l'activité de l'enzyme qui limite la glycolyse, nous pensons plutôt que c'est l'équilibre redox entre le NAD et le $NADH_2$ qui doit être tenu responsable de la faible glycolyse observée. A l'appui de cette affirmation, rappelons que l'oxydation du glucose et surtout du pyruvate est plus active dans les cellules que dans les homogénats, ce qui peut témoigner également d'un rapport $NADH_2$/NAD abaissé dans nos préparations cellulaires.

Ajoutons enfin pour compléter ces divers résultats expérimentaux que, constatant une respiration endogène notable mais plus faible dans nos préparations cellulaires que dans les homogénats, nous avons fait quelques tentatives pour en relever le niveau. Ni l'addition d'ions K^+ ni celle des milieux de lavage des hépatocytes n'ont eu d'effet positif. Il a fallu atteindre une forte concentration de NAD (7 mM par fiole) pour élever légèrement le $Q\,O_2$.

Il nous aurait fallu mesurer les rapports $\frac{P}{O}$ afin d'estimer

l'efficacité des oxydations phosphorylantes de nos suspensions cellulaires. Des travaux très récents d'Ichihara et coll. (1965) ont mis en évidence un couplage entre l'oxydation du succinate par les hépatocytes isolés et la phosphorylation de l'ADP, mesurée par l'incorporation du ^{32}P dans les molécules d'ATP synthétisées. Nous verrons dans le chapitre qui suit qu'il y a une très active incorporation de leucine-^{14}C dans les protéines de ces cellules, ce qui constitue une autre preuve de l'existence d'oxydations phosphorylantes, seul type d'oxydation ayant un net intérêt dans le « chimisme cellulaire » puisque permettant les biosynthèses à partir des molécules d'ATP formées.

En conclusion on peut dire que les hépatocytes, s'ils manifestent une respiration endogène faible, oxydent activement de nombreux substrats énergétiques : I.C.K., acides gras, alcool, glucose ; ce dernier nécessitant la présence d'ATP et NAD en quantités supérieures à celles qui persistent après l'isolement des cellules.

En ce qui concerne la glycolyse aérobie tout porte à admettre que, dans les conditions alors réalisées, l'oxydation de l'acide lactique se trouve accélérée par la disparition rapide de l'acide pyruvique formé en présence de NAD, ce qui déplace l'équilibre dans le sens d'une déshydrogénation de l'acide lactique.

III. — COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS SUR NOS HEPATOCYTES AVEC CEUX PUBLIES PAR D'AUTRES AUTEURS

Cette comparaison est difficile, car le comportement métabolique des cellules isolées varie grandement avec la méthode utilisée pour l'isolement. Nous signalerons que seules les cellules isolées à partir du foie de Souris par la technique de Berry (1962), laquelle comporte la perfusion et l'homogénéisation du tissu par une solution tamponnée de saccharose, ont conservé une nette respiration endogène, mais plus faible que celle des coupes. Reprise par Exton en 1964, puis par Iype et Bhargava en 1965, cette méthode leur a donné des résultats analogues pour les cellules isolées de Rat. Ces recherches ont porté sur l'ensemble des cellules hépatiques et non sur les hépatocytes exclusivement.

Par contre, de nombreux auteurs : Anderson (1953), Laws et Stickland (1956), Zimmerman (1960), Gibbons et Rienits (1961), Segard et coll., Kalant et Miyata (1963), Scarfinato

(1963) et Ichihara (1965), constatent que les cellules hépatiques isolées ont une respiration endogène négligeable ou nulle.

En dehors du succinate dont l'oxydation est observée par la plupart des auteurs, celle des autres intermédiaires du cycle de Krebs est généralement trouvée nulle ; seuls les auteurs qui isolent les cellules dans le saccharose constatent que certains de ces substrats augmentent la respiration endogène. Contrairement à nous, ces auteurs concluent à l'incapacité des hépatocytes isolés à oxyder le glucose et le glucose 6-phosphate.

Scarpinato signale l'oxydation des acides aminés et Exton celle des acides gras.

On peut conclure que les hépatocytes isolés par notre procédé ont des capacités d'oxydation se rapprochant plus de celles des cellules isolées en utilisant le saccharose que de celles de cellules isolées classiquement par action d'un agent complexant. Nous attribuons nos résultats satisfaisants à l'utilisation du Ficoll, qui limite les pertes de la phase cytoplasmique soluble, ce que doit réaliser également le saccharose dans la méthode de Berry. Nous examinerons dans un chapitre ultérieur comment beaucoup d'observations concernant les phénomènes de respiration ou de glycolyse peuvent s'expliquer par les modifications au cours de l'isolement de la perméabilité des membranes lipoprotéiques ou liporibonucléoprotéiques de la cellule.

CHAPITRE II

Activités anaboliques des hépatocytes isolés.

I. — LA SYNTHESE PROTEIQUE

Elle a été mise en évidence et mesurée par l'incorporation de leucine -^{14}C dans les protéines des hépatocytes isolés ; les essais ont été effectués dans le milieu de Hanks sans Ca^{++} et pour quelques expériences dans le milieu de Staehelin et Wettstein (*). On incube dans les fioles à 37° C l'équivalent de 25 à 35 mg de foie et on ajoute 0,328 µmole de leucine -^{14}C, soit une radioactivité de 1,25 µc, pour un volume final de 2 ml.

A. — Cinétique de l'incorporation de la leucine -^{14}C dans les hépatocytes.

La courbe de la figure 18 représente l'évolution de l'activité spécifique des protéines cellulaires durant les deux premières heures d'incubation.

Les activités pour une même suspension cellulaire sont identiques dans les deux milieux utilisés ; les variations individuelles sont importantes, l'activité spécifique croît linéairement pour certaines préparations alors qu'elle s'infléchit pour d'autres.

La quantité de leucine incorporée est si peu importante (130 µµmole par heure) par rapport à celle introduite dans le milieu que l'activité spécifique de celui-ci ne varie pas de façon appréciable. Le fléchissement de la courbe traduit donc un ralentissement de la vitesse de synthèse des protéines.

B. — Comparaison de la synthèse protéique dans les hépatocytes isolés et les homogénats.

Dans le cas des homogénats nous constatons une différence selon le milieu d'incubation : dans celui de Staehelin, il n'y a pas, comme dans celui de Hanks, un accroissement linéaire de l'activité spécifique avec le temps, elle atteint son maximum

(*) Formule de ce milieu : NH_4Cl 0,15 M, $MgCl_2$ 0,006 M ; saccharose 0,25 M, dans un tampon Tris 0,03 M de *p*H 7,4.

après 20 min. puis décroît. Les courbes A et B de la figure 19 illustrent deux expériences significatives à cet égard : A est obtenu en milieu de Staehelin, B en milieu de Hanks.

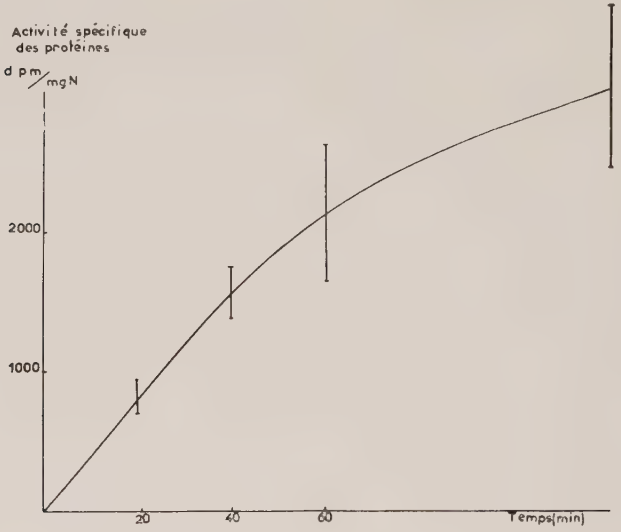


FIG. 18
Cinétique de l'incorporation *in vitro* de leucine -^{14}C dans les protéines des hépatocytes isolés.

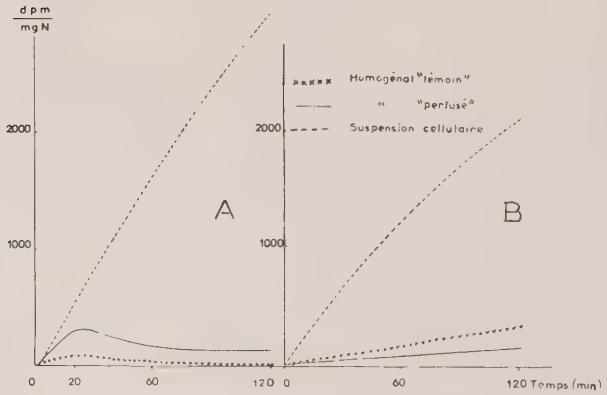


FIG. 19
Incorporation de leucine -^{14}C dans le milieu de Staehelin. Incorporation de leucine -^{14}C dans le milieu de Hanks sans Ca^{++}.

Dans le milieu de Hanks, l'activité spécifique des protéines après une heure d'incorporation, exprimée en désintégrations par min. et par mg d'azote, est égale à :

293 ± 10 dans l'homogénat de foie témoin ;
261 ± 84 dans l'homogénat de foie perfusé ;
2 136 ± 497 dans la suspension d'hépatocytes.

C. — Discussion des résultats.

1° Il ressort des valeurs ci-dessus qu'en moyenne l'incorporation de la leucine -^{14}C est sept à huit fois plus importante dans les cellules isolées que dans les homogénats ; mais correspond-elle à une synthèse protéique sept à huit fois plus active ? La perte de constituants azotés que nous avons signalée dans la troisième partie de ce mémoire comporte deux conséquences qui se répercutent sur le calcul des activités spécifiques.

a) L'addition de leucine dans le milieu d'incubation n'entraînait pas un excès tel que sa dilution par la leucine endogène puisse être à priori négligée.

Or, nous observions que le déficit des hépatocytes en azote total ne rendait pas compte uniquement de l'extrusion des protéines et suggérait une diminution de la concentration en acides aminés. La détermination des teneurs en acides aminés libres des trois préparations rapportées au DNA.P montre en effet que les hépatocytes ont perdu 74 % et l'homogénat de foie perfusé 40 % des acides aminés libres.

La faible teneur en acides aminés de l'homogénat de foie perfusé par rapport au témoin s'explique en partie par la teneur élevée en acides aminés du sang ; il subsiste, cependant, un léger déficit que le dosage de l'azote total ne permettait pas d'évaluer.

Afin de calculer la dilution du précurseur par la leucine endogène, nous avons déterminé cette dernière par chromatographie sur colonne à partir de l'acido-soluble des préparations. Nous avons constaté que la teneur en leucine libre du foie de Rat soumis à un jeûne de dix-sept heures était très faible. Dans 30 mg de poids frais (correspondant à l'échantillon incubé) nous avons trouvé respectivement 0,011, 0,007 et 0,003 µmoles de leucine endogène dans l'homogénat de foie témoin, de foie perfusé et la suspension cellulaire. Dès lors, la dilution n'entraînait qu'une réduction très faible (3 %) de l'activité spécifique du précurseur pour l'homogénat témoin et négligeable pour les autres préparations.

Teneurs en acides aminés libres.

	Homogénat de foie témoin	Homogénat de foie perfusé	Suspension d'hépatocytes
Acides aminés µg leucine par ml	474	244	48,6
DNA.P µg par ml..	26,7	22,8	9,93
Acides aminés / DNA.P	17,8 ± 1,14	10,7 ± 1,41	4,69 ± 0,50

b) La deuxième conséquence du déficit en substances azotées des hépatocytes isolés est liée au mode d'expression. En rapportant les activités spécifiques au mg d'azote, nous majorons l'activité réelle des cellules de 20 %.

En dépit de ces réserves, les cellules isolées manifestent une synthèse protéique six fois plus active que les homogénats.

2° Nous remarquons, en ce qui concerne les homogénats, que, dans le milieu de Staehelin, l'autolyse l'emporte rapidement sur la synthèse des protéines ; ce qui met en évidence la présence dans ces préparations d'un système protéolytique particulièrement actif. Etant donné que les expériences sur l'autolyse des homogénats (décrites en troisième partie) avaient montré la stabilité relative des protéines cellulaires à 37° C, il faut admettre une sensibilité particulière des protéines néoformées à cette protéase. La synthèse protéique active des cellules isolées peut s'expliquer par l'inactivation de ce système protéolytique ; cette hypothèse est étayée par le fait suivant : si, après leur isolement, nous homogénéisons les hépatocytes pour détruire leur structuration aussi complètement que possible, nous trouvons que leur activité synthétique reste identique à celle de la suspension cellulaire témoin. Ce n'est donc pas seulement l'homogénéisation en elle-même, et la rupture des lysosomes qu'elle provoque, qui est cause de cette différence de comportement entre homogénats et hépatocytes isolés.

Soulignons enfin que l'homogénat de foie perfusé présente dans le milieu de Hanks une activité plus faible que celle du témoin : ce qui est à rapprocher de la fragmentation des polysomes que nous avons observée dans ce matériel ; cependant, il présente une activité supérieure en milieu de Staehelin, que nous ne pouvons expliquer. A propos de ce milieu, précisons que l'addition de NH_4 a pour but de limiter l'activité ribonucléasique ; en effet, nous observons avec ce milieu dans les homogénats une légère augmentation de la synthèse protéique aux temps courts.

Dans le cas des cellules hépatiques de Rat isolées par Bucciolini et Marsilii (1961) ou par Scarpinato (1963) il n'y avait synthèse protéique qu'après addition de molécules riches en énergie (ATP) alors que, dans toutes nos expériences, *aucune adjonction* n'a été faite à nos suspensions. Ceci est, nous l'avons dit dans le précédent chapitre, une preuve que dans nos hépatocytes le *fonctionnement de la chaîne respiratoire est normal ;* il y a phosphorylation de l'ADP liée au transport des électrons.

Remarquons que, dès 1953, Le Page obtenait une synthèse protéique par les cellules hépatiques de Souris ; nos résultats sont en accord avec ceux de cet auteur.

Sans préjuger actuellement de la localisation des systèmes responsables de la synthèse protéique très active que nous constatons, nous pouvons affirmer que, dans les hépatocytes isolés, se trouvent réalisées des conditions extrêmement favorables à l'activité des différents types de RNA et des systèmes enzymatiques impliqués dans cette fonction.

II. — SYNTHESE D'ACIDE RIBONUCLEIQUE

Elle a été mesurée par l'incorporation *in vitro* d'acide orotique 6-^{14}C, précurseur naturel des bases pyrimidiques dans la molécule de RNA.

1° Conditions d'expérience.

Dans chaque fiole, nous incubons, à 37° C, environ 100 mg de tissu dans le milieu de Hanks sans calcium contenant 0,12 µmole d'acide orotique 6-^{14}C (activité spécifique 25,5 mc/mM). Les milieux sont préincubés avant l'addition du tissu et le volume est finalement ajusté à 5 ml.

Dans ces expériences, l'extraction et le dosage du RNA sont effectués par la méthode de Fleck et Monroe (1962).

Les essais concernent uniquement la cinétique d'incorpo-

ration de l'acide orotique dans les conditions décrites ; ils portent sur les suspensions d'hépatocytes, les homogénats de foie témoin et perfusé et sur les coupes de tissu.

2° Résultats expérimentaux.

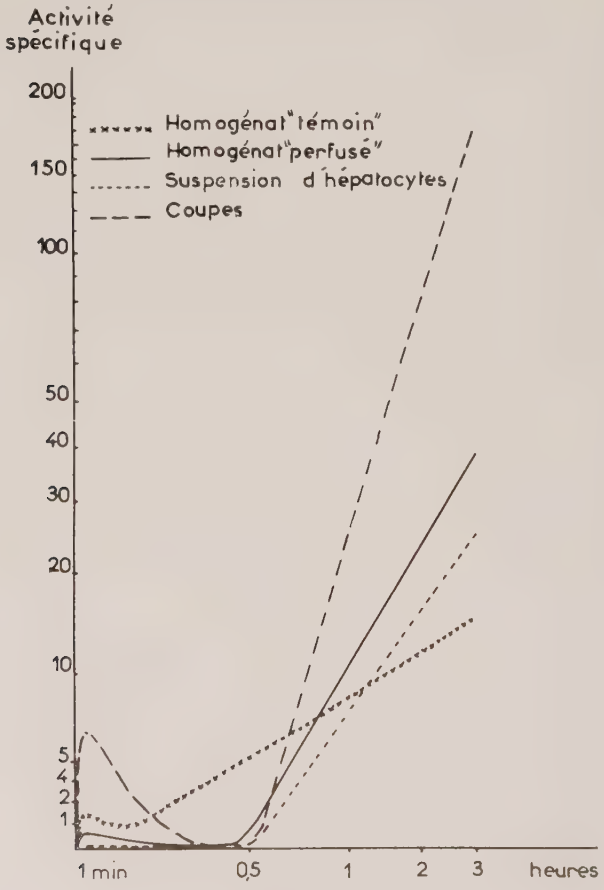


Fig. 20.

Cinétique de l'incorporation d'acide orotique-^{14}C.

Bien que peu nombreuse (4), ces expériences nous ont permis de mettre en évidence les faits suivants (*fig.* 20) :

a) L'activité spécifique du RNA dans les coupes est considérablement plus élevée que dans les autres matériaux biologiques ;

b) L'homogénat de foie perfusé et la suspension d'hépatocytes ont, pour les temps d'incorporation prolongés, une activité spécifique nettement supérieure à celle de l'homogénat de foie témoin ;

c) Un pic d'activité apparaît pour les incorporations de courte durée avec les coupes de tissu ; il n'est que légèrement ébauché avec le foie témoin.

3° Discussion.

Quelle signification faut-il donner à ces résultats ? Dans la fraction des RNA rapidement marqués, les RNA messagers occupent une place prépondérante, les autres RNA se marquant plus lentement. Les premiers sont beaucoup plus sensibles à l'activité ribonucléasique que les seconds.

Nous pouvons interpréter les faits en supposant que la RNAse n'est pas encore libérée dans les coupes aux temps courts, alors qu'elle est déjà libérée dans les hépatocytes et plus encore dans les homogénats. En troisième partie, nous avions mis en évidence l'activité élevée à 37° C de la RNAse dans les homogénats et les suspensions cellulaires que nous attribuons à la rupture de la membrane lysosiomale. Des expériences réalisées sur le foie entier nous ont montré effectivement que l'hydrolyse du RNA y est moins active (4,2 % par heure à 37° C) que dans les homogénats ou les suspensions cellulaires. Ces observations suggèrent que le pic d'activité observé dans les coupes aux temps courts puisse être attribué à la synthèse de RNA messagers.

Au-delà de 30 min., les activités spécifiques augmentent dans toutes les préparations. Ceci correspond sans aucun doute à la synthèse de RNA ribosomiaux et dans une plus faible mesure de RNA de transfert, puisque les RNA messagers sont dégradés au fur et à mesure de leur synthèse. Là encore, l'activité spécifique du RNA des coupes est supérieure à l'activité des homogénats et des suspensions cellulaires.

Nos expériences sont réalisées en l'absence d'inhibiteur, sans apport de co-facteurs ni d'énergie. Dans ces conditions, une interprétation des phénomènes observés ne peut être avancée. Retenons seulement que l'hépatocyte isolé est capable au même titre que les homogénats d'assurer le renouvellement de ses molécules de RNA.

CHAPITRE III

Considérations sur l'intégrité des hépatocytes isolés et le problème de la perméabilité des membranes.

Quel que soit leur procédé de préparation, les cellules hépatiques isolées se caractérisent par un métabolisme perturbé qui résulte, nous l'avons montré, d'une perte partielle de constituants solubles aux dépens du cytoplasme dispersé. Il apparaît cependant que les dommages sont qualitativement moins graves que l'analyse des constituants ne le laissait supposer. Les activités fonctionnelles sont conservées, cependant de nouveaux équilibres apparaissent, notamment au niveau des systèmes d'oxydoréduction qui peuvent donner lieu à des déviations métaboliques.

A quoi doit-on attribuer ces modifications de composition du suc cellulaire ? On peut envisager soit une rupture mécanique de la membrane, soit une modification de sa perméabilité.

Les examens submicroscopiques révèlent des points de rupture de la membrane, mais il n'est pas exclu qu'ils correspondent à des artefacts de fixation, car, à l'exception de substances azotées solubles, les autres constituants ne présentent pas de déficit par rapport à la composition de l'homogénat de foie perfusé.

La modification du potentiel de membrane sur laquelle repose notre principe d'isolement de cellules doit plus vraisemblablement être impliquée. Le mécanisme proposé par Shanes (1960) pour expliquer les changements de perméabilité d'une membrane au cours de la dépolarisation fait intervenir la mobilisation des ions Ca^{++}, il semble pouvoir s'appliquer aux cellules soumises à l'action d'un agent complexant. Selon cet auteur, l'élimination des ions Ca^{++} des sites superficiels augmenterait la perméabilité aux ions monovalents. De plus, en libérant les groupements négatifs de deux molécules voisines, l'élimination d'un ion Ca^{++} ouvre le passage aux ions aussi bien qu'aux grosses molécules à travers la membrane.

La dispersion des cellules d'un tissu et la modification de leur perméabilité sous l'influence de l'élimination du Ca^{++}

seraient donc liées au maintien de l'organisation de la membrane, ce qui est en accord avec l'hypothèse de Weiss (1959) selon laquelle : « les infiltrations cellulaires et les mouvements morphogénétiques reliés aux contacts cellulaires dépendent de la puissance de cohésion à l'intérieur des surfaces cellulaires plutôt que de la puissance des adhésions intercellulaires ».

Dès lors, il devient très problématique de trouver un procédé qui libérerait la cellule de ses contacts intercellulaires sans entraîner une fuite des constituants.

Pourtant ces modifications ne sont pas observées au même degré avec tous les types cellulaires. Les cellules d'embryon d'Oursin semblent avoir un comportement normal selon Giudice (1962) ; les cellules adipeuses métabolisent le glucose par les mêmes voies que le tissu et sans adjonction (Rodbell, 1964) ; les cellules isolées de la glande mammaire synthétisent, aux temps courts, les protéines comme la glande *in situ* (Turba et Hilpert, 1961) ; enfin la cellule rénale est moins modifiée par le procédé d'isolement que la cellule hépatique (Kalant et Miyata, 1963). De plus, selon Laws et Stickland (1956), Zimmerman et coll. (1960), après isolement et lavage les cellules cancéreuses (ascites ou tumeurs solides) conserveraient intacts leurs divers métabolismes ; il convient de dire que l'adhésivité moindre des cellules malignes entre elles pourrait expliquer que leur obtention plus facile comporte des altérations moindres que dans le cas des cellules provenant d'un tissu normal.

Ces faits suggèrent que le comportement des cellules isolées est lié au degré de cohésion de la membrane, lui-même en rapport avec le rôle physiologique de chaque type cellulaire. Il semble que l'hépatocyte, dont le rôle de sécrétion et de réserve est considérable, possède une membrane particulièrement vulnérable aux facteurs modifiant la perméabilité.

La perte d'enzymes solubles par l'hépatocyte est un désavantage évident mais peut présenter des aspects favorables. En effet, nous avons montré l'inactivation dans les cellules isolées d'un système protéolytique présent dans les homogénats ; en outre, selon la suggestion de Berry (1962), l'expérimentateur est libre de remplacer les enzymes manquants et co-facteurs dans des conditions contrôlées. Enfin l'augmentation de perméabilité de la cellule isolée permet d'étudier *in vitro* des synthèses dont l'étude était impossible sur coupe en raison de l'imperméabilité du substrat (ex. synthèse d'urée).

Comme l'hépatocyte isolé par notre technique a conservé

ses structures sans modification, qu'il témoigne d'une activité synthétique importante pour les protéines, nette pour le RNA, nous avons pensé qu'il pouvait être intéressant d'observer son comportement en culture *in vitro*.

Nous avons fait nos premiers essais sur des hépatocytes de jeunes Rats (un mois) en adoptant les conditions de culture *in vitro* publiées par Garvey (1961) pour cultiver les cellules parenchymateuses du foie de Lapin. Après cinq jours, nous observons l'adhésion au verre des cellules et une augmentation des cellules binucléées qui atteignent environ 80 % des cellules et enfin quelques étirements du cytoplasme, ce que Garvey avait décrit à cet âge de la culture. Au-delà, l'auteur envisage une croissance par activité amitotique des cellules. Nous n'avons pas, non plus, observé de figures mitotiques. Cependant, il y a une indiscutable augmentation des cellules binucléées, ce qui peut traduire soit une fusion de cellules soit un dédoublement des noyaux polyploïdes. Mais ce phénomène est resté indépendant d'une multiplication cellulaire. Nous pensons reprendre ces expériences sur d'autres milieux de culture en nous adressant à cette classe d'hépatocytes dont nous parlerons dans la cinquième partie de ce travail : les hépatocytes légers. Nous les prélèverons sur des foies en régénération au stade où leur activité de synthèse du DNA est la plus grande.

En résumé, le maintien en survie des hépatocytes que nous isolons sur des foies normaux est indiscutable, et montre que la cellule isolée est encore une cellule vivante.

Nous exposerons maintenant nos recherches sur le fractionnement en classes cellulaires des hépatocytes isolés.

CINQUIÈME PARTIE

FRACTIONNEMENT DES HÉPATOCYTES EN CLASSES DE DENSITÉ. ÉTUDE SUR LE FOIE NORMAL OU EN HYPERTROPHIE COMPENSATRICE. APPLICATION AU FOIE PORTEUR D'HÉPATOMES

CHAPITRE PREMIER

Caractères des classes d'hépatocytes isolés à partir du foie normal de Rats adultes.

Au cours du fractionnement des différents types cellulaires du foie, nous avons remarqué que la densité des hépatocytes isolés s'étage entre 1,115 et 1,165 sans discontinuité.

Afin de montrer que les variations de densité observées parmi les hépatocytes n'étaient pas dues à un artefact de préparation, nous avons renouvelé ces expériences sur des hépatocytes préparés par d'autres techniques (technique de SEGARD et coll., publiée en 1962, ou par dissociation mécanique simple) et modifié la distribution des hépatocytes avant la centrifugation en ajoutant les cellules non plus à la solution lourde mais à la solution légère du gradient (S_2). Dans tous les cas, nous avons retrouvé une distribution identique des hépatocytes : cette distinction des hépatocytes en fonction de leur densité semble donc présenter une *signification biologique*.

Nous nous sommes proposé de rechercher quels facteurs étaient responsables de ces variations de densité et quelle signification précise il convenait de leur attribuer. Nos investigations ont porté sur la composition en acides nucléiques, protéines, lipides totaux, phospholipides et cholestérol, glycogène, sur la mesure de quelques activités enzymatiques, ainsi que sur la vitesse de renouvellement du RNA des fractions d'hépatocytes isolés selon la méthode décrite en deuxième partie.

Rappelons que nous obtenons trois fractions caractérisées par leur densité moyenne :

— Les hépatocytes légers de densité 1,122 ;
— Les hépatocytes intermédiaires de densité 1,140 ;
— Les hépatocytes lourds de densité 1,158.

I. — INFLUENCE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE

Nos résultats pour tous les constituants analysés sont rassemblés dans le tableau XV.

Tableau XV

Composition des classes d'hépatocytes isolées par densité.

Classes de densité	1,122	1,140	1,158
DNA.P en µµg par cellule.	1,46 ± 0,08	1,38 ± 0,05	1.63 ± 0,16
RNA.P en µµg par cellule.	3,90 ± 0,11	3,82 ± 0,52	3,93 ± 0,17
PL.P. en µµg par cellule.	8,66 ± 0,46	8,86 ± 0,64	8,56 ± 0,66
NP en µµg par cellule ..	108 ± 6,66	105 ± 8,51	132 ± 22,5
Glycogène en µµg par mg N	27 ± 4,2	30 ± 6,1	31 ± 5,8
Lipides totaux en µµg par cellule	345 ± 30,2	303 ± 12,7	355 ± 17,4
Cholestérol en µµg par cellule	14 ± 1,7	11,3 ± 0,8	10,5 ± 1,2

1° Teneur en DNA.

Bien qu'en moyenne les hépatocytes lourds aient un contenu en DNA légèrement plus élevé que les autres, les différences de densité observées ne peuvent être attribuées ni au degré de ploïdie ni à la présence de cellules binucléées.

2° Teneurs en RNA et PL.

Nous avons groupé ces deux constituants, essentiellement localisés dans l'ergastoplasme, dont les teneurs reflètent ainsi l'importance de cette structure dans la cellule. Il n'apparaît pas

de variations significatives de ces constituants dans les classes d'hépatocytes que nous isolons.

3° Teneurs en protéines.

Les protéines sont après l'eau le constituant pondéralement le plus important de l'hépatocyte. En se référant aux séparations par densité en milieu salin (CsCl) de la fraction lipoprotéique du sérum, on remarque que la densité des albumines dépasse 1,21. Il était donc vraisemblable que les variations de teneur en protéines des cellules aient un retentissement sur leur densité. Nous trouvons effectivement une concentration plus élevée de ces constituants dans les hépatocytes lourds.

Teneurs en glycogène.

La densité moyenne des hépatocytes de Rat non soumis à un jeûne est supérieure (densités comprises entre 1,13 et 1,20) à celle des hépatocytes de Rat jeûnant depuis 16 à 17 heures, qui, par le fait du jeûne, perdent 95 % de leur glycogène. La distribution en fonction de la densité étant, bien qu'à des niveaux différents, identique dans les deux cas, le contenu en glycogène ne pouvait être tenu responsable des différences de densité observées parmi les hépatocytes d'un même animal. Enfin, dans le foie du Rat à jeun, il ne représente que 0,1 % du poids du tissu. Nos déterminations ne mettent pas en évidence de variations nettes ; le sens de ces dernières s'inversent même dans certaines expériences.

5° Teneurs en lipides totaux et cholestérol.

Les courbes de la figure 21 représentent la distribution des lipides totaux et du cholestérol libre et estérifié en fonction de la densité des hépatocytes. Les hépatocytes intermédiaires sont moins riches en lipides que les extrêmes, ces derniers ayant approximativement le même contenu.

Lors d'un jeûne de 16 à 17 heures, les rats étant maintenus à 25° C, la chute des teneurs en lipides totaux est peu importante. D'après nos résultats, il semble, cependant, que l'oxydation des lipides ait été plus active dans les cellules légères. Nous devons rappeler que les teneurs observées représentent la différence entre l'apport des lipides (glycérides) aux cellules par mobilisation des graisses de dépôt et leur vitesse d'oxydation.

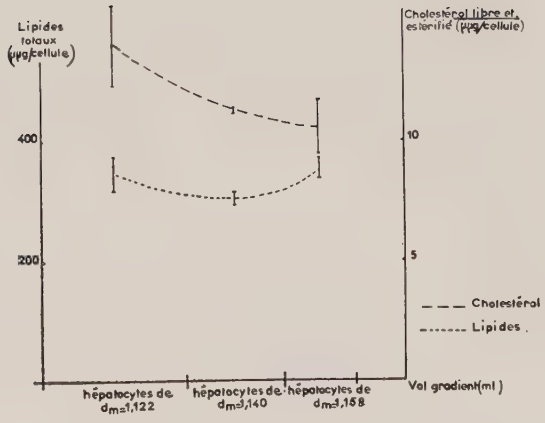


FIG. 21

Teneurs en lipides et cholestérol des hépatocytes en fonction de leur distribution en gradient de densité.

Dans les hépatocytes du Rat non à jeun, le contenu en lipides totaux est de :

595 µµg ± 123 dans les hépatocytes de $d_m = 1{,}122$;

429 µµg ± 29 dans les hépatocytes de $d_m = 1{,}140$;

466 µµg ± 91 dans les hépatocytes de $d_m = 1{,}158$.

L'évaluation du contenu en cholestérol libre et estérifié montre une variation régulière inverse de la densité. Nous pouvons en déduire une variation de teneur en eau de ces cellules en nous référant aux travaux de MAYER et SCHAEFFER (1913), qui établissaient les rapports entre la teneur en cholestérol et l'imbibition d'un tissu.

II. — REPARTITION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Les essais ont porté sur l'activité des phosphatases (alcaline et acide), de la glucose 6-phosphatase et de la lactate déshydrogénase.

Nos résultats, moyennes de 3 expériences, se résument ainsi :

a) L'activité phosphatase alcaline, mesurée en présence de Mg^{++}, est environ deux fois plus intense dans la classe des hépatocytes légers que dans les deux autres ;

b) L'activité phosphatase acide est, au contraire, supérieure de 30 % dans les cellules lourdes ;

c) L'activité glucose 6-phosphatasique est également plus élevée pour les hépatocytes lourds que pour les légers ;

d) Il en va de même pour l'activité lactate déshydrogénase nettement plus élevée dans les hépatocytes lourds.

III. — RENOUVELLEMENT DU RNA NUCLEAIRE

L'animal reçoit, 45 min. avant le sacrifice, 15 µc d'acide orotique 6-^{14}C. Les hépatocytes sont alors isolés et séparés par classe puis les noyaux des hépatocytes de chaque classe sont isolés. La mesure de la radioactivité porte sur le RNA extrait de ces noyaux.

Nous constatons que l'incorporation du précurseur dans la molécule de RNA a lieu dans le noyau des différentes classes d'hépatocytes avec sensiblement la même vitesse. En effet, nous obtenons pour les :

hépatocytes légers = 5 270 dpm par µg de RNA.P ;
hépatocytes moyens = 4 900 dpm par µg de RNA.P ;
hépatocytes lourds = 4 950 dpm par µg de RNA.P.

En assimilant cette fonction au niveau des synthèses cellulaires, il semble donc que les cellules au repos et après un jeûne court présentent un niveau d'activité assez constant.

*
* *

En résumé, les différents constituants étudiés varient peu, à l'exception du cholestérol et des protéines. La teneur en cholestérol étant liée à la teneur en eau d'un tissu, il semble bien que la variation de densité des hépatocytes soit surtout réglée par l'imbibition du tissu. La concentration en protéines varie en raison inverse de la teneur en cholestérol, c'est-à-dire de la teneur en eau des hépatocytes.

La répartition des activités enzymatiques n'est pas uniforme : la phosphatase alcaline est plus active dans les hépatocytes légers, alors que les autres enzymes étudiés le sont moins ; ce qui suggère des *différences d'activité fonctionnelle* dans les fractions d'hépatocytes.

Quel sens faut-il donner à cette classification des hépatocytes ? A quoi peut-on identifier ces fractions ? Nous avons montré qu'il n'existait pas de rapports entre la densité des

hépatocytes et leur degré de ploïdie ou le nombre de leurs noyaux. Cependant, il existe une autre sorte d'hétérogénéité au sein des cellules du parenchyme hépatique, en rapport avec leur localisation spatiale. Les histologistes distinguent dans le lobule hépatique des zones d'activités différentes qui se marquent par des aspects cytologiques différents. Selon Chevremont (1960), on peut distinguer trois zones : la zone périphérique ou périportale dont les cellules travaillent d'une manière permanente et renferment beaucoup d'enclaves, la zone centrale dont les cellules sont au repos et qui serait une zone de suppléance, la zone moyenne enfin est une zone intermédiaire qui n'interviendrait qu'au moment de la digestion. Les histochimistes (Novikoff, 1958 ; Guha, 1960 ; Eger, 1961) démontrent également la spécialisation fonctionnelle de la périphérie et du centre du lobule en s'appuyant sur la répartition des activités enzymatiques ; ils insistent toutefois sur la grande plasticité fonctionnelle des différentes zones qui peuvent se remplacer mutuellement. De même, les microanalyses biochimiques de Shank (1959) ont mis en évidence l'hétérogénéité enzymatique du lobule. Cette spécialisation se justifierait par la topographie du lobule : la zone périphérique portale recevant en plus grande abondance que la zone centrale les substances véhiculées par le sang : métabolites, oxygène, toxines, etc.

Néanmoins, les informations publiées sur cette hétérogénéité fonctionnelle du lobule sont rares et quelquefois même contradictoires. Si nous confrontons nos résultats, concernant la composition des fractions aux données confirmées, deux faits seulement nous permettent de suggérer que la distribution par densité reflète la distribution intralobulaire des hépatocytes :

a) *Les variations de la polyploïdie.*

Sulkin a décrit l'augmentation de la polyploïdie dans la zone centrale ; or, les hépatocytes lourds ont une teneur en DNA légèrement supérieure aux autres.

b) *La distribution enzymatique.*

Les seules données incontestables à ce sujet, confirmées par Shank et Eger, concernent l'augmentation de la teneur en phosphatase alcaline dans la zone périphérique. Nous avons mis en évidence que cette activité est nettement plus élevée dans les hépatocytes légers.

A partir de ces deux observations, *les hépatocytes légers appartiendraient à la zone périportale du lobule et les hépatocytes lourds à la zone centrolobulaire.*

Récemment, des études auto-historadiographiques (Grisham, 1962 ; Oehlert et coll., 1962 ; de Recondo et Frayssinet, 1963) ont illustré des variations de comportement des hépatocytes selon leur localisation, au cours de la régénération qui suit l'hépatectomie partielle. Nos recherches concernant la synthèse du DNA dans les hépatocytes régénérés, décrites au chapitre suivant, vont nous permettre d'étayer cette identification des classes d'hépatocytes isolées par densité.

CHAPITRE II

Études sur les classes d'hépatocytes du foie en hypertrophie compensatrice.

Nous avons choisi la régénération du foie après hépatectomie partielle comme type d'étude des hépatocytes prélevés lors d'une activité mitotique normale chez le Rat adulte. Selon la définition donnée par E. Terroine : « Provoquer la régénération d'un tissu, c'est déterminer une croissance temporaire limitée et rapide au cours de laquelle peut être étudié le comportement individuel des divers constituants cellulaires » (1960).

L'hépatectomie a été pratiquée selon la méthode de Higgins et Anderson, elle porte sur les deux tiers du foie.

La préparation des hépatocytes a été calquée sur celle utilisée pour le foie normal. Signalons que, la capsule de Glisson se rompant ici fréquemment, la perfusion doit être effectuée sous plus faible pression. L'efficacité de la perfusion est malgré tout plus grande en raison, sans doute, de l'augmentation du lit vasculaire. La dispersion du tissu s'opère très facilement, ce qui confirme les données concernant la faible adhésivité des cellules dans les tissus en voie de prolifération.

I. — DENSITE DES HEPATOCYTES

Nous fractionnons les hépatocytes sur gradient de densités comprises entre 1,16 et 1,09, car les hépatocytes sont dans ce cas très allégés : à la 20e heure après l'hépatectomie, la majorité d'entre eux a une densité voisine de 1,10. Une stéatose s'installe rapidement après l'opération, qui double la concentration en lipides du foie, à laquelle on peut sans aucun doute attribuer ces variations de densité.

La densité moyenne des hépatocytes va progressivement s'élever, dès la 67e heure elle atteint 1,14 et la distribution des hépatocytes est alors très proche de la distribution normale. La diminution de la teneur en graisses intervient vraisembla-

blement dans cette augmentation de densité puisque au 7e jour après hépatectomie les lipides se distribuent ainsi :

Hépatocytes légers : 900 ± 300 µg par cellule ;
Hépatocytes moyens : 225 ± 51 µg par cellule ;
Hépatocytes lourds : 429 ± 51 µg par cellule.

Nous observons donc que la fraction légère présente à ce stade un contenu élevé en graisses.

II. — COMPOSITION CHIMIQUE EN FONCTION DU TEMPS ECOULE DEPUIS L'HEPATECTOMIE

Aux temps courts après l'hépatectomie, la variation des densités étant réduite, les cellules ont été prélevées en deux fractions.

Tableau XVI

Composition des classes d'hépatocytes en voie de prolifération.

Classes d'hépatocytes	Temps après hépatectomie	DNA.P µµg par cellule	RNA.P µµg par cellule	PL.P µµg par cellule	NP µµg par cellule
Hépatocytes légers	20 heures	1,24 ± 0,05	6,61 ± 1,04	10,60 ± 0,2	—
Hépatocytes lourds		1,60 ± 0,12	7,30 ± 0,24	11,25 ± 0,1	—
Hépatocytes légers	67 heures	1,67 ± 0,15	—	—	—
Hépatocytes lourds		1,52 ± 0,23			
Hepatotytes légers	15 jours	1,38 ± 0,20	4,06 ± 0,30	7,15 ± 0,2	112 ± 2,5
Hépatocytes intermédiaires		1,57 ± 0,14	5,36 ± 0,24	8,12 ± 0,9	149 ± 3,0
Hépatocytes lourds		1,67 ± 0,05	5,79 ± 0,46	9,12 + 0,1	153 ± 2,5

Du tableau XVI groupant nos résultats nous pouvons dégager les faits suivants :

1° *La teneur en DNA.P* par cellule, à la 20e heure après hépatectomie partielle, a diminué en ce qui concerne les hépatocytes légers ; ce qui doit être l'indice du dédoublement des hépatocytes binucléés plusieurs fois signalé au cours des

premières heures qui suivent l'hépatectomie (voir troisième partie). A la 67e heure, phase de multiplication active, les hépatocytes légers ont alors un contenu en DNA.P très élevé et légèrement supérieur à celui des hépatocytes lourds. Enfin, 15 jours après l'hépatectomie, le contenu en DNA.P des différentes fractions d'hépatocytes est redevenu semblable à celui des hépatocytes du foie normal ; ceci est apparemment en désaccord avec les résultats de nombreux auteurs (cités en troisième partie) mettant en évidence l'augmentation de la polyploïdie après hépatectomie partielle. Cependant, les études de Suklin (1943) sur le pourcentage de cellules binucléées après hépatectomie font apparaître qu'après complète restauration le foie ne contient que la moitié des cellules binucléées du foie normal. La résultante de ces deux phénomènes (polyploïdie augmentée et binucléation diminuée) se traduit, pour les hépatocytes régénérés, par une teneur moyenne en DNA.P peu différente de la normale.

2° A la 20e heure, le *rapport nucléoplasmique* exprimé par le rapport RNA.P/DNA.P des hépatocytes légers est augmenté de 100 % et celui des hépatocytes lourds de 89 %. La synthèse du DNA étant à peine amorcée à cette phase de la régénération, nous pouvons considérer que cette augmentation mesure, en pourcentage du RNA initial, la synthèse nette du RNA. Frayssinet (1962) a montré que la synthèse nette du RNA évaluée sur l'organe entier atteignait environ 65 % à la 20e heure. Pour interpréter ces différences, il faut admettre que la synthèse nette du RNA est essentiellement sinon exclusivement parenchymateuse.

Nous observons, 15 jours après hépatectomie, un contenu encore élevé en RNA.P des hépatocytes de toutes les classes, mais particulièrement des hépatocytes lourds, le rapport nucléoplasmique reste élevé, confirmant les résultats de Frayssinet selon lesquels la synthèse nette de DNA à ce stade de la régénération est de 150 %, alors que celle du RNA atteint 210 %.

3° Dans les hépatocytes légers, *le rapport du PL.P au DNA.P* est augmenté de 44 % et celui des hépatocytes lourds est de 34 %. Les hépatocytes légers représentant, à la 20e heure, 80 % des hépatocytes, la synthèse nette de PL par l'ensemble des hépatocytes est de 42 %.

Nous n'observons pas une différence aussi tranchée que dans le cas du RNA entre les valeurs de la synthèse nette de PL

obtenues sur les hépatocytes seuls et celles obtenues par Frayssinet sur le foie entier (environ 35 %). Cela n'exclut pas, cependant, que la synthèse nette de PL provienne exclusivement des cellules parenchymateuses, car nous avons mis en évidence (voir tableau VII) que les cellules non parenchymateuses contenaient 3 à 4 fois moins de PL que les hépatocytes.

Le contenu moyen des hépatocytes en PL est redevenu normal 15 jours après l'hépatectomie, cependant les hépatocytes lourds restent plus riches en ce constituant.

4° La détermination du contenu en *protéines* n'a été effectuée que 15 jours après hépatectomie, les hépatocytes ont alors un contenu normal en protéines.

En résumé, *la teneur en DNA.P par cellule dans les hépatocytes n'a augmenté que dans les hépatocytes légers* entre le début de la synthèse de DNA (20e heure) et la 67e heure après l'hépatectomie. A la 20e heure après l'hépatectomie partielle, *les hépatocytes semblent les seuls responsables des synthèses nettes de RNA et de PL.* Les observations de Grisham (1962), Edwards et Koch (1964) montrant le déclenchement tardif des mitoses dans les cellules non parenchymateuses sont en faveur d'une activité de synthèse peu importante de ces cellules, à la 20e heure après l'hépatectomie partielle.

III. — ETUDE DE LA SYNTHESE DU DNA

Nos études ont porté, d'une part, sur le devenir des premiers hépatocytes qui synthétisent le DNA après hépatectomie partielle, d'autre part, sur les variations de distribution de la radioactivité en fonction de l'heure à laquelle le précurseur est injecté.

1° Evolution en fonction du temps de la radioactivité spécifique des fractions après une injection unique de précurseur 19 heures après hépatectomie.

Chaque animal reçoit, quel que soit son poids (250 à 350 g), une quantité égale de thymidine tritiée qui correspond à une radioactivité de 100 µc. Les animaux sont sacrifiés à des temps variables après l'injection du précurseur : 1 h., 5 h., 24 h., 48 h. et 45 jours, soit 20 h., 24 h., 43 h., 67 h. et 46 jours après l'hépatectomie partielle.

Les résultats exprimés sous forme de diagrammes A, B, C, D et E correspondant aux différents temps d'incorporation sont reproduits figure 22. (Afin de simplifier la comparaison, nous avons réuni, dans le diagramme E, les fractions d'hépatocytes lourds et intermédiaires.) Chaque fraction d'hépatocytes est représentée par un rectangle dont la base est proportionnelle au nombre de cellules et la hauteur à l'activité spécifique du DNA. Sa surface peut donc être considérée comme proportionnelle à la radioactivité totale de la fraction. Sa position sur l'axe des abscisses est fixée par la densité moyenne de la fraction.

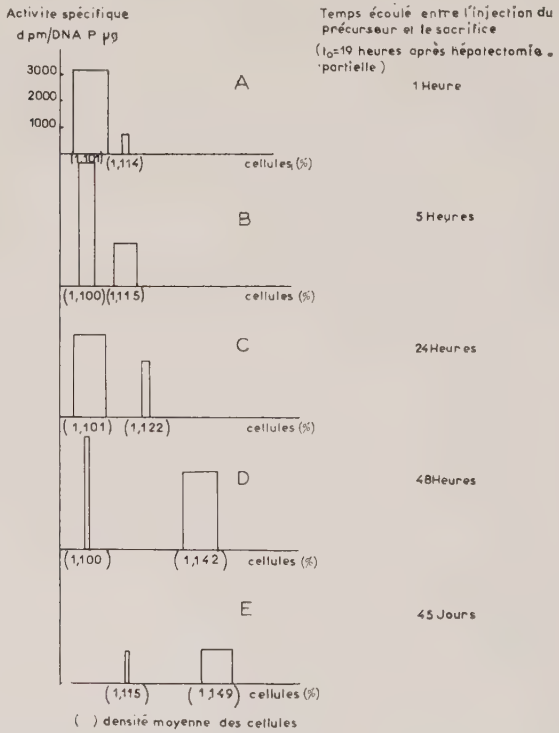


Fig. 22
Evolution des hépatocytes marqués avant la première vague de mitoses.

Après 1 heure d'incorporation du précurseur (A.), nous constatons que les hépatocytes légers ont une activité spécifique

4 à 5 fois plus grande que les hépatocytes lourds. Après 5 heures d'incorporation (B), avant que ne commencent les mitoses, le rapport des activités spécifiques entre les deux populations reste identique. A la 24e heure (C) et plus encore à la 48e heure (D) après l'injection, l'activité des hépatocytes lourds augmente. A ce moment, 67 heures après l'hépatectomie, l'activité des hépatocytes lourds atteint 78 % de celle des légers ; la densité moyenne des hépatocytes atteint alors 1,14. Après 45 jours (E), le rapport des activités s'inverse légèrement.

Pour interpréter l'évolution des activités spécifiques dans les deux populations d'hépatocytes que nous isolons, nous ne tiendrons compte que des variations du rapport des activités pour un temps donné, car (nous l'avons précisé plus haut) la dose de radioactivité injectée n'est pas rigoureusement la même par gramme de foie pour chaque série d'animaux.

A la 20e heure après hépatectomie partielle, avant que ne se déclenchent les mitoses, les *premiers hépatocytes qui synthétisent le DNA après l'ablation sont localisés en majorité dans la fraction la plus légère.*

Nous observons ensuite au fur et à mesure de l'alourdissement des hépatocytes que le rapport des activités spécifiques entre les deux populations d'une même série va en augmentant et que, dès la 67e heure, la presque totalité de la radioactivité se localise dans les hépatocytes de densité 1,142. Il y a donc eu *migration d'hépatocytes marqués* vers les zones denses du gradient.

Aux stades 67e heure et 46e jour, les densités des deux populations étant alors stabilisées, nous remarquons que les hépatocytes se répartissent en pourcentage de façon identique, cependant que le rapport des activités spécifiques s'est inversé. La dilution du DNA marqué par le DNA synthétisé au cours de cette période est donc plus grande dans les hépatocytes légers que dans les hépatocytes lourds ; ce qui nous permet de conclure, l'injection du traceur n'étant pas renouvelée, *que la durée de vie moyenne des hépatocytes légers est plus courte.*

Cette interprétation trouve une confirmation dans l'augmentation de la teneur en DNA.P par cellule des hépatocytes légers entre la 20e heure et la 67e heure.

2° Distribution de la radioactivité après l'incorporation du précurseur a différentes phases de la régénération.

Le précurseur est administré aux 19e, 48e et 72e heures après

hépatectomie et le sacrifice a lieu 45 jours plus tard quand les hépatocytes ont retrouvé un niveau d'activité normal.

Un diagramme (fig. 23) résume nos résultats.

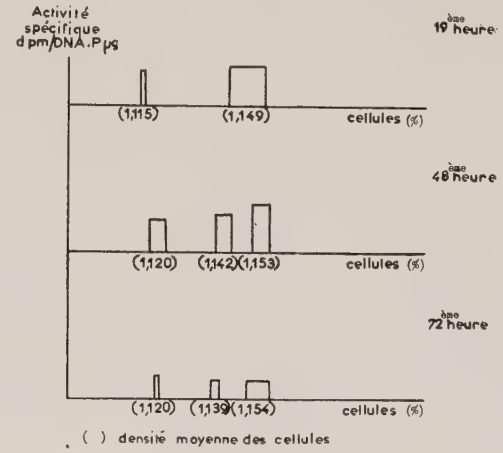


Fig. 23

Distribution de la radioactivité quarante-cinq jours après injection du précurseur. Incorporation aux temps dix-neuf, quarante-huit et soixante-douze heures après hépatectomie partielle.

L'interprétation que nous avons donnée de l'évolution de l'activité spécifique des différentes populations en fonction du temps nous permet encore d'expliquer les variations de l'activité spécifique selon l'heure d'injection du traceur. Quand l'incorporation a lieu à la 19e et à la 48e heures, l'activité spécifique des hépatocytes légers est plus faible en raison de la dilution par le DNA synthétisé ultérieurement. Par contre, quand l'injection est effectuée à la 72e heure, l'activité de synthèse commençant alors à diminuer, la dilution par le DNA synthétique est moins importante et l'activité spécifique des hépatocytes légers est à nouveau supérieure à celle des hépatocytes lourds.

En *conclusion,* cette étude de la synthèse du DNA dans les fractions isolées d'hépatocytes suggère que les plus légers d'entre eux synthétiseraient les premiers le DNA et auraient une durée de vie moyenne plus courte que les autres. Ces derniers, au degré de ploïdie plus élevé, semblent moins aptes à se diviser. Il n'est pas douteux qu'une étude auto-radiographique des populations

isolées pourrait apporter plus d'informations sur les phénomènes observés que les déterminations d'activités spécifiques du DNA n'en peuvent donner.

L'importance de la zone périlobulaire dans le processus d'hypertrophie compensatrice a été soulignée par l'auto-historadiographie, les premières synthèses de DNA étant localisées dans cette zone. Nos hépatocytes légers peuvent être, de ce point de vue, considérés comme les hépatocytes de la zone périlobulaire ; une partie d'entre eux gagnent les régions les plus basses du gradient de densité (assimilées aux zones intermédiaire et centrale du lobule), cependant les hépatocytes de la région supérieure conservent une activité de synthèse plus intense. En outre, des études auto-historadiographiques ont mis en évidence dans le lobule la répartition uniforme du marquage quand le sacrifice a lieu à la fin des synthèses, la première vague de mitoses ayant été marquée ; c'est également ce que nous observons quand le précurseur est injecté 19 heures après l'hépatectomie et que l'animal est sacrifié 45 jours plus tard, c'est-à-dire après complète régénération.

CHAPITRE III

Étude du fractionnement des hépatocytes isolés à partir de foies porteurs d'hépatomes.

Les résultats fragmentaires que nous avons rassemblés ici veulent simplement illustrer l'intérêt que, selon nous, le fractionnement en classes des hépatocytes présente en Cancérologie.

A l'hétérogénéité du tissu hépatique normal se superpose, dans le cas d'un tissu tumoral, l'hétérogénéité des cellules cancéreuses que Caspersson (1950) classe en cellules A à synthèse très active, cellules B et cellules nécrotiques. Il existe encore, comme le soulignent Le Breton et Moulé (1961), un autre type d'hétérogénéité dépendant des conditions d'expérimentation et, en particulier, de l'agent carcinogène ; ce dernier entraînant soit des « lésions spécifiques qui sont causes ou conséquences de la carcinogenèse, soit des lésions concomitantes dues à la toxicité de l'agent et qui seules ne pourraient induire la cancérisation » (*). La dédifférenciation biochimique, liée à la dédifférenciation morphologique, est la conséquence de ces lésions cellulaires non spécifiques (Devlin, 1961 ; Morris, 1963 ; Le Breton et coll., 1963).

A. — OBTENTION DES FRACTIONS

Nos expériences ont porté sur deux séries de Rats, les uns, de souche Wistar, étaient soumis au régime de Miller (1948) déséquilibré contenant 0,06 % de DAB, les autres, de souche Sprague-Dawley, ingéraient le régime de Le Breton (1955) équilibré, mais carencé en choline et ayant même teneur en DAB. Après six mois pour la première série, huit mois pour la seconde, les animaux étaient sacrifiés, tous les foies présentaient des nodules tumoraux à un stade avancé. Les hépatocytes ont été isolés, dans le cas des Rats soumis au régime de Miller,

(*) Rappelons le cas du 3' MeDAB dont l'ingestion, même dans des régimes équilibrés, conduit au bouleversement du pourcentage des différents types cellulaires dans le tissu hépatique.

à partir, d'une part, du tissu « non tumoral » et, d'autre part, des nodules tumoraux du foie alors que dans le cas des Rats soumis au régime Le Breton, les hépatocytes ont été isolés à partir du foie entier.

Le fractionnement a été effectué sur gradient de densités comprises entre 1,12 et 1,19, car les variations de densité sont dans ce cas plus importantes ; les zones sont nettement plus individualisées que dans le cas des hépatocytes normaux.

B. — CARACTERISATION DES CLASSES D'HEPATOCYTES

1° Rats soumis au régime Miller.

Nous avons séparé quatre fractions distinctes de densités égales à 1,12, 1,14, 1,15 et 1,17. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XVII.

L'examen des rapports entre les différents constituants fait apparaître d'importantes variations de la composition d'une classe à l'autre, les hépatocytes lourds sont particulièrement modifiés. Il y a une grande chute des teneurs en RNA, PL et protéines, rapportées au DNA. Par contre, les cellules légères sont moins affectées et, même, la concentration des PL est normale. Nous avons comparé ces fractions obtenues sur le tissu « non tumoral » à celles qui sont préparées à partir des nodules tumoraux et constaté qu'ici les densités s'étagent de 1,15 à 1,19 et que, pour toutes les fractions cellulaires prélevées, le rapport PL.P/DNA.P est très diminué puisqu'il varie entre 2,5 et 1,9 (valeurs pour la fraction lourde).

Il semble donc que les cellules lourdes obtenues par fractionnement des hépatocytes du tissu « non tumoral » peuvent être identifiées aux cellules des nodules « tête d'épingle » décelables macroscopiquement.

2° Rats soumis au régime Le Breton.

Dans ces expériences, les teneurs ont été rapportées à la cellule, ce qui est le plus significatif. On observe que les cellules légères du tissu « non tumoral » ont une teneur en DNA.P de 1,94 µµg, ce qui correspond à un haut degré de ploïdie, alors que les cellules lourdes sont dans l'ensemble diploïdes et mononucléées. La zone intermédiaire est constituée d'hépatocytes ayant une teneur normale en DNA.

TABLEAUX XVII *Caractérisation des fractions d'hépatocytes obtenus à partir de foies porteurs d'hépatomes.*

1° *Rats soumis au régime déséquilibré : composition.*

Densité des fractions	DNA.P µg/fraction	RNA.P µg/fraction	PL.P µg/fraction	NP µg/fraction	PL.P / DNA.P	RNA.P / DNA.P	NP / DNA.P
1,12	73,8 ± 6,6	127,5 ± 5,5	501 ± 24	3817 ± 492	6,78	1,72	51,8
1,14	42 ± 12,4	92,6 ± 19	322 ± 55	2292 ± 371	7,67	2,20	54,7
1,15	54,4 ± 1	95,1 ± 15,8	248 ± 39	1995 ± 245	4,55	1,74	36,7
1,17	27,3 ± 2,4	19,8 ± 1,9	31,2 ± 5,2	453 ± 56	1,14	0,72	16,6

2° *Rats soumis au régime équilibré :* A. — *Composition.*

Densité des fractions	DNA.P µµg/cellule	RNA.P µµg/cellule	PL.P µµg/cellule	NP µµg/cellule	PL.P / DNA.P	RNA.P / DNA.P	NP / DNA.P
1,13	1,94 ± 0,07	5,24 ± 0,30	10,28 ± 0,27	116 ± 3,5	5,29	2,70	59,8
1,17	1,46 ± 0,10	4,87 ± 0,91	8,64 ± 0,28	95 ± 8,2	5,91	3,33	65
1,19	0,87 ± 0,06	3,30 ± 0,05	6,63 ± 0,57	75,6 ± 10,8	7,62	3,79	87

B. — *Activité de synthèse du DNA.*

Densité des fractions	Nombre de cellules (pourcentage)	Désintégrations par min. / DNA µg	Désintégrations par min. / 10^6 cellules
1,13	12	761	1487 ± 580
1,17	41	96	145 ± 69
1,19	47	92	79 ± 23

La composition des cellules légères serait normale si elle ne présentait un déficit en protéines d'environ 35 % ; les cellules lourdes ont un rapport nucléoplasmique et une teneur en PL.P élevés par rapport aux cellules d'un foie témoin, ici les protéines ont conservé leur concentration.

Le fait important est que les hépatocytes provenant du foie porteur de tumeurs, *des Rats ayant ingéré le régime équilibré, ne fournissent pas de classes cellulaires ayant une composition profondément modifiée*, ce que nous avons constaté pour les hépatocytes lourds dans le cas des foies de Rats ayant ingéré le régime MILLER.

Pour tenter de mettre en évidence la présence de cellules à multiplication active, nous avons mesuré la vitesse d'incorporation de la thymidine tritiée dans le DNA des trois classes d'hépatocytes. La croissance de la tumeur étant relativement lente avec ce régime, nous avons administré aux animaux, en quatre injections espacées de plusieurs heures, 400 µc de thymidine -^{3}H.

De nos résultats (tableaux XVII) il ressort nettement *que la quasi-totalité des cellules qui synthétisent le DNA se trouvent localisées dans la couche de cellules légères ;* ce que confirme, dans une certaine mesure, la teneur plus élevée en DNA.P trouvée dans les cellules.

C. — DISCUSSION

Nous pensons utile, à la compréhension des quelques données qui précèdent, de faire un bref rappel de notions les unes classiques, les autres traduisant l'attitude de E. LE BRETON et coll. (1963) sur l'utilisation des résultats expérimentaux de la plupart des auteurs qui ont étudié le cancer expérimental du foie chez le Rat.

L'agent carcinogène induit le processus cancéreux. Le temps de latence avant l'apparition de la multiplication cellulaire cancéreuse est fonction des conditions de vie de l'animal et notamment des conditions nutritionnelles et hormonales (CHANY et coll., 1963), les états infectieux ont aussi une grande importance.

En outre, les conditions dans lesquelles se produit l'évolution de la cellule normale vers l'état cancéreux modifient profondément la constitution et le comportement métabolique des cellules tumorales. On a longtemps considéré que certains carac-

tères des cellules tumorales étaient spécifiques de la lésion cancéreuse, on sait aujourd'hui que les hépatomes obtenus dans certaines conditions expérimentales ne présentent aucune de ces déviations métaboliques, notamment leur glycolyse aérobie est normale. L'hépatome n° 5123 de Morris, présentant un minimum de déviations métaboliques, montre à l'examen cytologique ou histologique une grande similitude avec le tissu hépatique normal, malgré la prolifération cancéreuse et la formation de métastases.

Nos résultats illustrent le fait que les hépatocytes d'hépatomes obtenus dans notre Institut présentent également une composition biochimique pratiquement normale, même dans le cas des hépatocytes à multiplication très active ; ces hépatomes constituent donc un excellent matériel d'étude des lésions spécifiques des cellules tumorales.

Nous identifions les hépatocytes à synthèse très active que nous avons isolés avec les cellules A de la classification des cellules tumorales établie par Caspersson. Les travaux autoradiographiques de Zamecnik (1951) localisaient les cellules à synthèse protéique active des foies porteurs d'hépatomes dans la zone périnodulaire. Il est vraisemblable que les hépatocytes à multiplication rapide que nous isolons correspondent à cette *zone périnodulaire,* mais cette hypothèse reste à vérifier.

Nous avons isolé également une population de cellules, inactives quant à la synthèse du DNA, numériquement très importantes. La teneur en DNA par cellule indique qu'il s'agit essentiellement de cellules diploïdes. Nous rejoignons ainsi les observations histologiques de Mark et Ris (1949), Swift (1950), Thomson et Frazer (1954), qui concluaient à l'augmentation des cellules diploïdes au cours de la carcinogenèse du foie.

En conclusion, ces résultats soulignent l'intérêt de recherches sur les cellules précancéreuses et cancéreuses qui porteraient sur les seules cellules parenchymateuses. En effet, il semble possible de localiser les cellules fixant électivement le carcinogène et de déceler à quel moment, précédant l'apparition de nodules tumoraux perceptibles, se manifeste une synthèse active de DNA, premier symptôme à l'heure actuelle de la cancérisation, et si ce sont toujours les hépatocytes légers qui sont les premiers intéressés. Mais, surtout, nous pensons que sur la fraction d'hépatocytes isolée par densité qui est responsable des synthèses de DNA dans la tumeur, il doit être possible de saisir les caractères spécifiques des cellules cancéreuses. Que

ces modifications se traduisent finalement par des mutations génétiques, cela ne fait plus de doute, mais quels sont les facteurs intracellulaires « mutagènes » ? Cette question est étudiée par divers collaborateurs de E. Le Breton, nous pensons contribuer à lui donner une réponse en poursuivant des recherches sur les classes d'hépatocytes isolés.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Cette étude consacrée à l'hépatocyte isolé de Rat porte sur un ensemble de recherches cytologiques, biochimiques et métaboliques. Ses buts étaient *d'éprouver* ce nouveau matériel d'étude biologique qu'est la cellule isolée de tissu solide et de préciser, à partir de l'hépatocyte, quelles perspectives il ouvrait dans le domaine de la Physiologie cellulaire.

Dans une *première partie,* les techniques analytiques appliquées aux homogénats de tissu hépatique ou aux suspensions cellulaires ont été exposées. Notre contribution dans ce domaine a porté sur :

1° La mise au point et l'étude théorique d'un dosage de l'ion Ag^+ (ou $Ag(NH_3)_2^+$) dans les milieux biologiques ; cet élément à l'état colloïdal était utilisé comme indicateur des cellules de Küpffer dans les suspensions de cellules hépatiques ;

2° L'adaptation d'un dosage d'acides aminés au milieu perchlorique 5 % ;

3° La mesure directe de la radioactivité des protéines marquées ;

4° La mise au point d'un dosage spécifique de l'hémoglobine permettant d'évaluer le volume sanguin d'un tissu.

La *deuxième partie* est consacrée aux méthodes d'isolement et de fractionnement du tissu hépatique. Nous avons, en premier lieu, résumé les données actuelles concernant les relations intercellulaires et la cohésion des tissus épithéliaux, particulièrement dans le cas du tissu hépatique. Ces considérations nous ont conduit à classer les différentes méthodes d'isolement de cellules à partir de tissus solides en deux groupes suivant leur mode d'action : les unes agissant sur les protéines de l'ultrastructure superficielle et des fibres conjonctives, les autres intervenant en modifiant le potentiel de membrane.

C'est à ce dernier groupe qu'il faut rattacher la méthode d'isolement que nous avons élaborée. Elle permet de retrouver à l'état dispersé, sous forme de suspension cellulaire, 40 % du

tissu hépatique. Elle a été appliquée au tissu hépatique normal de Rat adulte et au tissu hépatique en voie de prolifération, après hépatectomie partielle ou induction d'un processus de cancérisation.

L'application des méthodes de centrifugation différentielle aux suspensions de cellules hépatiques isolées a permis de recueillir les hépatocytes à l'état pratiquement pur (contamination évaluée à 2 %).

Le fractionnement des hépatocytes en classes a été réalisé par sédimentation en gradients de densité. Ces derniers ont été produits à partir de solutions d'un polysaccharide de synthèse, le Ficoll, dans un modèle de mélangeur particulier dont la description et le principe ont été donnés. Nous obtenons finalement des suspensions d'hépatocytes caractérisées par leur densité moyenne ; ainsi, dans le cas du tissu normal, nous isolons trois classes d'hépatocytes de densité : 1,122 ; 1,140 et 1,158.

Les examens submicroscopiques ont permis de conclure à la bonne conservation morphologique des structures de l'hépatocyte isolé ; toutefois, des points de rupture de la membrane externe sont visibles, mais il n'est pas exclu qu'ils proviennent du procédé de fixation.

L'analyse biochimique de l'hépatocyte fait l'objet de la *troisième partie.*

Au préalable, les effets de la perfusion sur la composition du tissu hépatique ont été examinés : nous avons mis en évidence et évalué la rétention du milieu de perfusion, la participation du sang à la composition de l'homogénat dit « témoin » ainsi que le rôle d'un inhibiteur sérique de la ribonucléase dans la stabilité de l'acide ribonucléique.

L'étude biochimique des suspensions d'hépatocytes présente un intérêt double :

1° Elle porte sur les cellules parenchymateuses *à l'exclusion des autres types cellulaires* qui représentent environ 40 % des cellules du tissu hépatique ;

2° Elle permet d'atteindre les véritables teneurs cellulaires, car toute détermination peut être rapportée directement *à la cellule,* l'unité fonctionnelle, à l'encontre de l'analyse biochimique globale. A ce propos, nous avons établi que la présence de cellules binucléées et de cellules à noyaux polyploïdes, dont l'importance varie selon les états physiologiques et patho-

logiques, interdit dans le cas du foie d'évaluer le nombre de cellules d'un échantillon à partir du contenu en acide désoxyribonucléique d'un noyau (constante d'une espèce donnée, uniquement dans le cas de la cellule somatique normale).

Il en résulte que les teneurs de l'hépatocyte diffèrent des données classiques sur la composition de la cellule hépatique obtenue à partir de l'analyse chimique globale. L'hépatocyte isolé contient :

16 µµg d'acide désoxyribonucléique ;
41 µµg d'acide ribonucléique ;
215 µµg de phospholipides ;
675 µµg de protéines ;
138 µµg d'azote.

Par la comparaison de ces valeurs à celles obtenues par l'analyse de l'homogénat de foie perfusé, nous avons établi :

1° Que les teneurs en acide ribonucléique et phospholipides rapportées à l'acide désoxyribonucléique des hépatocytes étaient respectivement deux à trois fois supérieures à celles des cellules non parenchymateuses ;

2° Que le procédé d'isolement donnait lieu à une extrusion d'une part importante des composés azotés de la phase soluble, qui affecte préférentiellement certaines protéines (l'exemple de la lactate déshydrogénase illustre cette migration privilégiée).

L'examen de quelques activités enzymatiques (glucose 6-phosphatase, succinoxydase, phosphatase acide et alcaline et adénosine triphosphatase) a permis de conclure à la conservation des enzymes liés à une structure organisée.

De la composition des structures intracellulaires isolées des hépatocytes deux faits se dégagent nettement :

1° Le déficit important en protéines de la phase soluble cytoplasmique ;

2° La teneur élevée en phospholipides des noyaux par rapport à celle des noyaux isolés de l'ensemble des cellules du foie.

Dans la *quatrième partie,* il est traité des activités métaboliques des hépatocytes isolés.

Nous avons constaté que l'activité respiratoire endogène des hépatocytes isolés est égale à la moitié de celle du tissu perfusé. L'étude de l'oxydation des substrats exogènes et des

quelques activités anaboliques mesurées a montré que cette faible respiration endogène observée dans les hépatocytes isolés relevait plus de la perte de substrats endogènes et de co-facteurs que d'un fonctionnement anormal du cycle de Krebs ou de la chaîne respiratoire.

De plus, l'activité glycolytique (en aérobiose) mesurée par la production d'acide lactique apparaît faible, les conditions réalisées favorisant la transformation acide lactique ⟶ acide pyruvique ; la vitesse d'oxydation de ce dernier dans les mitochondries est très élevée.

En outre, les hépatocytes manifestent une activité de synthèse protéique *six fois* plus élevée que celle des homogénats. Cette étude a été effectuée dans deux milieux d'incubation : dans un milieu physiologique classique et en présence de l'ion NH_4 qui limite l'action de la ribonucléase.

Enfin, la synthèse d'acide ribonucléique mesurée en milieu physiologique sans apport exogène n'a été nettement mise en évidence que dans le cas de l'acide ribonucléique ribosomal. Elle est alors supérieure pour l'homogénat de foie perfusé et la suspension cellulaire à celle de l'homogénat de foie témoin. Cette synthèse est plus active dans les coupes de tissu que dans les autres matériaux biologiques et présente un pic d'activité correspondant aux acides ribonucléiques rapidement marqués.

Une relation a été établie entre, d'une part, la perte partielle des composés protéiques du suc cellulaire et le comportement métabolique particulier qui en résulte et, d'autre part, les modifications de perméabilité qu'entraîne tout procédé d'isolement.

En dépit de sa perméabilité modifiée, l'hépatocyte isolé peut être maintenu en survie par culture *in vitro* et, nous l'avons démontré par ailleurs, ses mécanismes fonctionnels sont intacts. La cellule isolée, organite qui conserve en place ses structures et dont cependant les échanges avec le milieu extérieur sont immédiats, peut se substituer valablement aux homogénats pour toutes les déterminations biochimiques.

Les études métaboliques *in vitro* permettent d'apprécier l'hépatocyte isolé en tant que matériel d'étude, mais non de comparer son métabolisme à celui des cellules non parenchymateuses. Seules, les études métaboliques *in vivo* peuvent être appliquées à cette fin. Nous les avons limitées à la caractérisation des fractions isolées d'hépatocytes (synthèse des acides nucléiques), mais elles appellent d'autres développements.

Dans la *cinquième partie,* sont exposées nos recherches concernant la caractérisation biochimique et métabolique des classes d'hépatocytes isolées par densité.

Le chapitre I est consacré aux hépatocytes normaux. Nous attribuons aux variations du coefficient lipocytique et de la teneur en protéines les variations de densité observées entre les différentes classes, et il est suggéré que la distribution des hépatocytes en fonction de leur densité reflète leur *répartition intralobulaire.* L'analyse chimique et enzymatique fournit des arguments à l'appui de cette interprétation.

Dans le chapitre II, les classes d'hépatocytes à différentes étapes de la régénération après hépatectomie partielle ont été caractérisées par leur composition et leur activité de synthèse de l'acide désoxyribonucléique. Il a été établi que la classe des hépatocytes légers, assimilée à la zone périportale du lobule hépatique, effectuait en premier la duplication de l'acide désoxyribonucléique et que sa durée de vie moyenne était la plus courte.

Enfin, le chapitre III traite de l'identification des classes d'hépatocytes obtenus à partir de foies porteurs de tumeurs. Les hépatomes ont été induits par l'administration d'un carcinogène à des Rats soumis, par ailleurs, au régime équilibré de E. Le Breton (1955). Nous avons pu isoler une classe d'hépatocytes, représentant 12 % de la totalité, *seule responsable de la synthèse du DNA et dont la composition chimique est pratiquement normale.* Cette classe a été identifiée avec les cellules à multiplication rapide (A) de la classification des cellules tumorales proposée par Caspersson. La majorité de la population parenchymateuse des foies porteurs de tumeurs est essentiellement constituée d'hépatocytes diploïdes, inactifs quant à la duplication de l'acide désoxyribonucléique.

*
* *

En conclusion de cette étude, la cellule isolée de tissu solide apparaît comme un organite entier et vivant à l'égal d'une cellule d'ascite ou d'un microorganisme et qui échappe aux régulations de l'organisme dont il provient.

Appliqué au tissu hépatique, objet de ce travail, l'isolement de cellules permet de reprendre l'étude biochimique des phénomènes biologiques à une échelle réellement cellulaire puisque

les déterminations sont rapportées à la cellule d'une population homogène.

En outre, la possibilité d'isoler d'un tissu en voie de prolifération — normale ou cancéreuse — les cellules responsables de la multiplication cellulaire ouvre une nouvelle voie d'investigation de la régulation des processus de croissance et de l'induction néoplasique.

Ces recherches sur l'hépatocyte ont, pensons-nous, démontré l'intérêt méthodologique et dégagé les nouvelles possibilités d'expérimentation qu'offre la cellule isolée de tissu solide en matière de Physiologie de la cellule normale et cancéreuse.

BIBLIOGRAPHIE

ABERCROMBIE (M.) et AMBROSE (E. J.). — *Cancer Res.*, 1962, **22**, 525.
ABERCROMBIE (M.) et HARKNESS (R. D.). — *Proc. Roy. Soc. B.*, 1951, **138**, 544.
ALFERT (M.). — *Symposium on fine structures of cells*, Leiden, 1954.
ALLARD (C.), de LAMIRANDE (G.), FARIA (H.) et CANTERO (A.). — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1954, **32**, 383.
AMBROSE (E. J.) et EASTY (G. C.). — *Acta Unio Intern. contra Cancrum*, 1960, **16**, 36.
ANDERSON (N. G.). — *Science*, 1953, **117**, 627.
ANDERSON (N. G.). — *Physical Techniques in Biological Research*, Oster et Pollister (Acad. Press N. Y.), 1956.
ATERMAN (K.). — *Acta Anat.*, 1958, **32**, 193.
BARKER (S. B.) et SUMMERSON (W. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138**, 535.
BARSKI (G.) et CHOUCROUN (N.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1964, **258**, 2442.
BEAMS (H. W.) et KING (R. L.). — *Anat. Record*, 1942, **83**, 281.
BEARD (J. W.) et ROUS (P.). — *J. Exptl. Med.*, 1934, **59**, 593.
BEAUFAY (H.). — *Biochem. J.*, 1962, **84**, 10 P.
BEHRENS (M.). — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1938, **253**, 185.
BEN-OR (S.), EISENBERG (S.) et DOLJANSKI (F.). — *Nature*, 1960, **188**, 1200.
BERRY (M. N.). — *J. Cell. Biol.*, 1962, **15**, 1.
BOCK (R. M.) et LING (N. S.). — *Anal. Chem.*, 1954, **26**, 1543.
BOIVIN (A.), VENDRELY (R.) et VENDRELY (C.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1948, **226**, 1061.
BRAKKE (M. K.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, **45**, 275.
BRANSTER (M. V.) et MORTON (R. K.). — *Nature*, 1957, **180**, 1283.
BUCCIOLINI (M. G.) et MARSILII (G.). — *Bol. soc. ital. biol. Sper.*, 1961, **37**, 126.
BÜCHER (N. R. L.) et GLINOS (A. D.). — *Cancer Res.*, 1950, **10**, 324.
BUNDENBERG de JONG (H.). — *Colloïd Science* (Kruyt-Elsevier, Amsterdam), 1949.
BURCHARD (H.). — *Chem. Zentr.*, 1890, **61**, 25.
CASTAGNA (M.). — *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 1961, **6**, 795.
CASTAGNA (M.). — *Nature*, 1965, **205**, 905.
CASTAGNA (M.) et CHAUVEAU (J.). — *Bull. soc. chim.*, 1961, **6**, 1165.
CASTAGNA (M.) et CHAUVEAU (J.). — *C. R. Acad. sciences*, 1963, **257**, 969.
CAMPBELL (R. M.) et KOSTERLITZ (H. W.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1952, **8**, 663.
CASPERSSON (T. O.). — *Cell Growth and Cell Function* (Norton, N. Y.), 1950.
CHALKLEY (M. W.). — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1943, **4**, 47.
CHANY (E.), BOY (J.) et LE BRETON (E.). — *Arch. Sc. Physiol.*, 1963, **17**, 3.
CHAUVEAU (J.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1952, **235**, 902.
CHAUVEAU (J.). — *Ann. Nutrition et Aliment.*, 1960, **14**, 37.

Chevallier (F.). — *C. R. soc. biol.*, 1957, **151**, 892.
Chevremont (M.). — *Notions de Cytologie et Histologie* (Desoert, Liège), 1960.
Cossel (L.). — *Beitr. pathol. Anat. U. Allgem. Pathol.*, 1959, **120**, 133.
Cunningham (L.), Griffin (A. C.) et Luck (J. M.). — *J. Gen. Physiol.*, 1950, **34**, 59.
Curtis (A. S. G.). — *Am. Naturalist*, 1960, **94**, 37.
Danielli (J. F.) et Davson (H.). — *J. Cellular Comp. Physiol.*, 1953. **5**, 495.
Daoust (R.) et Cantero (A.). — *Cancer Res.*, 1959, **19**, 757.
Davenport (J. B.). — *Biochem. J.*, 1962, **84**, 18.
Davidson (J. N.). — *La biochimie des acides nucléiques* (Dunod, Paris), 1960.
Delorme (E. J.), Mac Pherson (A. I. S.), Mukherjee (S. R.) et Rowlands (S.). — *Quart. J. Exptl. Physiol.*, 1951, **36**, 219.
Dervichian (G.). — *Exposés actuels : problèmes de structures, d'ultrastructures et de fonctions cellulaires* (Masson, Paris), 1955, **4**, 103.
Delvin (T. M.) et Boxer (G. E.). — *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, 1961, **3**, 220.
Dickens (F.) et Simer (F.). — *Biochem. J.*, 1931, **25**, 981.
Dounce (A. L.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **151**, 235.
Dubois (K. P.) et Potter (V. R.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **150**, 184.
Duran-Reynals (F.). — *Bacteriol. Rev.*, 1942, **6**, 197.
Duve (C. de). — *Bull. soc. chim. biol.*, 1960, **1**, 11.
Duve (C. de). — *Biochem. J.*, 1962, **84**, 1 P.
Duve (C. de), Berthet (J.) et Beaufay (M.). — *Progr. in Biophys. and Biophys. Chem.*, 1959, **9**, 326.
Easty (G. C.) et Mutolo (V.). — *Exptl. Cell Res.*, 1960, **21**, 374.
Edwards (J. L.) et Koch (A.). — *Lab. Invest*, 1964, **13**, 32.
Eger (W.). — *Arztliche Sammelblätter*, 1961, 1.
Elias (H.) et Pauly (J. E.). — *Human Microanatomy* (Da Vinci, Chicago), 1960.
Elliott (K. A. C.) et Libet (B.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, **143**, 227.
Ely (J. O.) et Ross (M. H.). — *J. Franklin Inst.*, 1951, **252**, 277.
Essner (E.), Sato (H.) et Belkin (M.). — *Exptl. Cell Res.*, 1954, **7**, 430.
Exton (J. H.). — *Biochem J.*, 1964, **92**, 457.
Falzone (J. A.), Barrows (C. M.) et Yiengst (M. T.). — *Exptl. Cell Res.*, 1961, **26**, 552.
Feldman (M.). — *J. Embryol. Exptl. Morphol.*, 1955, **3**, 251.
Fenn (W. O.). — *J. Biol. Chem.*, 1939, **128**, 297.
Fisher (R. F.), Holbrook (D. J.) et Irvin (J. L.). — *J. Cell Biol.*, 1963, **17**, 231.
Fleck (A.) et Monroe (H. N.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1962, **55**, 571.
Frayssinet (Ch.). — *Thèse de Doctorat d'Etat*, Paris, 1962.
Gaja (G.). — *Il Fegato*, 1959, **5**, 277.
Garvey (J. S.). — *Nature*, 1961, **191**, 972.
Gibbons (J. L.) et Rienits (R G.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1961, **47**, 395.
Gibson (J. G.), Seligman (A. M.), Peacock (W. C.), Aub (J. C.). Fine (J.) et Evans (R. D.). — *J. Clin. Invest.*, 1946, **25**, 848.

Grant (H. C.) et Rees (K. R.). — *Proc. Roy. Soc. B.*, 1958, **148**, 117.
Greeley (A.). — *Biol. Bull.*, 1904, **7**, 117.
Grisham (J. W.). — *Cancer Res.*, 1962, **22**, 842.
Gruskin (B. J.). — *Lab. Clin. Med.*, 1932, **17**, 1237.
Guha (S.). et Wegman (R.). — *Bull. soc. chim. biol.*, 1960, **42**, 115.
Guidice (C.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, **99**, 447.
Hall (D. A.) — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **67**, 366.
Harel (L.). — *Thèse de Doctorat d'Etat*, Paris, 1959.
Harel (L.), Jacob (A.) et Moulé (Y.). — *Bull. soc. chim. biol.*, 1957, **39**, 819.
Harkness (R. D.) — *J. Physiol.*, 1952, **116**, 373.
Harrison (M. F.). — *Nature*, 1951, **168**, 248.
Harrison (M. F.). — *Nature*, 1953, **171**, 611.
Henley (K. S.), Sorensen (O.), Pollard (H. M.). — *Nature*, 1959, **184**, 1400.
Henley (K. S.), Sorensen (O.). — *Federation Proc.*, 1959, **18**, 245.
Hers (H. G.), Berthet (J.), Berthet (L.) et Duve (C. de). — *Bull. soc. chim. biol.*, 1951, **33**, 21.
Hiatt (H. H.). — *J. Mol. Biol.*, 1962, **5**, 217.
Higgins (G. M.) et Anderson (R. M.). — *Arch. pathol.*, 1931, **12**, 186.
Hilal (S. K.). — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, **114**, 661.
Himes (M.), Hoffman (J.) et Pollister (A. W.). — *J. M. Sinai Hosp. N. Y.*, 1957, **24**, 935.
Holter (H.) et Möller (K. M.). — *Exptl. Cell Res.*, 1958, **15**, 63.
Holzer (H.), Sedlmayr (G.) et Kemnitz (A.). — *Biochem. Z.*, 1956, **328**, 116.
Ichihara (A.), Tanioka (H.) et Takeda (Y.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1965, **87**, 9.
Iype (P. T.) et Bhargava (P. M.). — *Biochem. J.*, 1965, **94**, 284.
Jacob (S. T.) et Bhargava (P. M.). — *Exptl. Cell Res.*, 1962, **27**, 453.
Kalant (H.) et Miyata (R.). — *Biochem. J.*, 1963, **86**, 336.
Kalant (H.) et Young (F. G.). — *Nature*, 1957, **179**, 816.
Kaliss (N.) et Pressman (D.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1950, **75**, 16.
Kaltenbach (J. P.). — *Exptl. Cell Res.*, 1954, **7**, 568.
Kamahora (J.) et Uenischi (A.). — *Med. J. Osaka Univ.*, 1954, **5**, 621.
Kemp (A.). et Kits van Heijningen (A. J. M.). — *Biochem. J.*, 1954, **54**, 646.
Kornberg (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 481.
Kosterlitz (H. W.). — *J. Physiol.*, 1947, **106**, 194.
Kuff (E. L.), Hogeboom (G. H.) et Dalton (A. J.). — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, **2**, 33.
Küpffer (C.). — *Arch. Mikroskop. Anat.*, 1899, **54**, 254.
Laws (J. O.) et Stickland (L. H.). — *Nature*, 1956, **178**, 309.
Laws (J. O.) et Stickland (L. H.). — *Exptl. Cell Res.*, 1961. **24**, 240.
Le Breton (E.). — *Biochem. problems of lipids* (Butterworths, London), 1955.
Le Breton (E.) et Moulé (Y.). — *The Cell*, Brachet et Mirsky (Acad. Press, N. Y.), 1961.
Le Breton (E.), Boy (J.), Chany (E.), Frayssinet (Ch.), Jacob (A.), Moulé (Y.) et Recondo (A. M. de). — Les tumeurs malignes du foie (Masson, Paris), 1963.
Lehninger (A. L.). — *The mitochondrion* (Benjamin, New York), 1964.

Le Page (G. A.). — *Cancer Res.*, 1953, **13**, 178.
Leuchtenberger (C.), Leuchtenberger (R.), Vendrely (R.) et Vendrely (C.). — *Exptl. Cell Res.*, 1952, **3**, 240.
Loeven (W.). — *Acta Anat.*, 1955, **24**, 217.
Longmuir (I. S.) et Rees (W.). — *Nature*, 1956, **117**, 997.
Machebœuf (M.), Delsal (J.-J.). — *Bull. soc. chim. biol.*, 1943, **25**, 116
McIllwain (H.). — *Proc. Univ. Otago Med. School*, 1954, **32**, 17.
Madden (S. C.) et Whipple (G. H.). — *Physiol. Rev.*, 1940, **20**, 194.
Mandel (P.), *Exposés annuels de Biochimie médicale*, 1951.
Mark (D. D.) et Ris (H.), *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1949, **71**, 727.
Mayer (A.) et Schaeffer (G.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1913, **156**, 1253.
Medawar (P.). — *Nature*, 1941, **148**, 783.
Mejbaum (W.). — *Hoppe Seyler Z.*, 1939, **258**. 117.
Melnick (J. L.), Rappaport (C.), Banker (D.) et Bhatt (P.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1955, **88**, 676.
Meyer (K.). — *Advan. Protein Chem.*, 1945, **2**, 249.
Mikhailova (U. L.) et Hadjiolov (A. A.). — *Congr. intern. biochim.*, Moscou, 1961.
Miller (L. L.) et Bale (W. F). — *J. Exptl. Med.*, 1954, **99**, 125.
Miller (E. C.), Miller (J. A.), Kline (B. E.) et Rusch (H. P.). — *J. Exptl. Med.*, 1948, **88**, 89.
Moore (S.) et Stein (W. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1954, **211**, 893.
Morris (H. P.). — *Prog. Exptl. Tumor Res.*, 1963, **3**, 371.
Moscona (A.). — *Comm. personnelle* (Rinaldini, 1958).
Moscona (M. H.) et Moscona (A. A.). — *Science*, 1963, **142**, 1070.
Moulé (Y.). — *Arch. Sc. Physiol.*, 1953, **7**, 161.
Moulé (Y.), Chauveau (J.) et Rouiller (C.). — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, **7**, 547.
Naora (H.) et Naora (H.). — *Exptl. Cell. Res.*, 1964, **33**, 151.
Novikoff (A. B.). — *J. Histochem. Cytochem.*, 1958, **6**, 251.
Novikoff (A. B.) et Essner (E.). — *Am. J. Med.*, 1960, **29**, 102.
Novikoff (A. B.), Podber (E.), Ryan (J.) et Noe (E.). — *J. Histochem. Cytochem.*, 1953, **1**, 27.
Oehlert (W.), Hammerling (W.) et Buchner (F.). — *Beitr. Pathol. Anat. Cell Pathol.*, 1962, **126**, 91.
Ozoszlan (S. I.), Rizvi (S.), O'Connor (T. E.) et Mora (P. T.). — *Nature*, 1964, **202**, 780.
Paigen (K.). — *J. Biol. Chem.*, 1954, **206**, 945.
Palade (G. E.). — *J. Exptl. Med.*, 1952, **95**, 285.
Palade (G. E.) et Claude (A.). — *J. Morphol.*, 1949, **85**, 35.
Palade (G. E.) et Siekevitz (P.). — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, **2**, 171.
Partridge (S). — *Biochem. J.*, 1948, **43**, 387.
Ponder (E.). — *Hemolysis and Related Phenomena* (Grune et Stratton, N. Y.), 1948.
Ponder (E.). — *The Cell*, Brachet et Mirsky (Acad. Press., N. Y.), 1961.
Popper (H.), Paronetto (F.), Schaffner (F.) et Perez (U.). — *Lab. Invest.*, 1961, **10**, 265.
Potter (Van R.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, **169**, 17.
Pragay (D. A.). — *Experimental*, 1962, **18**, 116.
Price (J. M.) et Laird (A. K.). — *Cancer Res.*, 1950, **10**, 650.
Recondo (A. M. de) et Frayssinet (Ch.). — *J. Phys.*, 1963, **55**, 242.

Rigas (D. A.) et Koler (R. D.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1961, **58**, 242.
Rinaldini (L. M. J.). — *Intern. Rev. Cytol.*, 1958, **7**, 587.
Robertson (J. D.). — *The ultrastructure of cell membrane, Biochem. Soc. Symposia*, Cambridge, 1959.
Rodbell (M. J.). — *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 375.
Rose (I. A.) et Schweigert (B. S.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, N. Y., 1952, **79**, 541.
Rothschild (J. A.). — *Federation Proc.*, 1961, **20**, 145.
Rouiller (Ch.) et Jézequel (A. M.). — *The liver*, Rouiller (Acad.) Press), 1963.
Rous (P.) et Jones (F.). — *J. Exptl. Med.*, 1961, **23**, 549.
Russel (J. A.) — *J. Biol. Chem.*, 1944, **156**, 457.
Rutter (W. J.) et Brosemer (R. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 1247.
Rüttner (J. R.) et Vogel (A.). — *Verhandl. deut. Ges. Pathol.*, 1958, **41**, 314.
Saint-Aubin (P. M. G.)) et Bücher (N. L. R.). — *Anat. Record*, 1952, **112**, 797.
Saint-Georges (S.), Friedman (M.) et Byers (S. O.). — *Science*, 1954, **120**, 463.
Scarpinato (B.). — *Lo sperimentale*, 1963, **113**, 251.
Schneider (W. C.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, **161**, 293.
Schneider (W. C.) et Potter (V. R.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **149**, 217.
Schrek (R.). — *Arch. Pathol.*, 1944, **37**, 319.
Schmidt (G.) et Thannhauser (S. J.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, **161**, 83.
Segard (E.), Montreuil (J.)., Colbeau (A.), Dupont (A.), Demaille (A.) et Driessens (J.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1962, **255**, 1479.
Segard (E.). Montreuil (J.), Colbeau (A.), Dupont (A.), Demaille (A.) Mangez (C.), Adenis (L.), Driessens (J.). — *C. R. soc. biol.*, 1962, **156**, 1102.
Shank (R. E.), Morrison (G.), Cheng (C. H.), Karl (I.), Schwartz (R.) — *J. Histochem. Cytochem.*, 1959, **7**, 237.
Shanes (A. M.). — *Nature*, 1960, **188**, 1209.
Sibatini (A.) et Fukuda (M.). — *Cytologia* (Tokyo), 1953, **18**, 80.
Smellie (R. M. S.). — *Progress in Nucleic Acid Research*, Davidson et Cohn, 1963.
Staehelin, communication personnelle (Y. Moulé).
Steiner (J. W.). — *Am. J. Pathol.*, 1961, **38**, 411.
Storey (R. H.), Wish (L.) et Furth (J.). — *Cancer Res.*, 1951, **11**, 943.
Stowell (R. E.). — *Lab. Invest.*, 1952, **1**, 210.
Striebich (M. J.), Shelton (E.) et Schneider (W.). — *Cancer Res.*, 1953, **13**, 279.
Sulkin (N. H.). — *Am. J. Anat.*, 1943, **73**, 107.
Swift (H. H.). — *Physiol. Zool.*, 1950, **23**, 169.
Teorell (T.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1935, **33**, 282.
Terroine (E. F.). — *Le métabolisme nucléique* (C.N.R.S.), 1960
Thomson (R. Y.) et Frazer (S. C.). — *Exptl. Cell Res.*, 1954, **6**, 367.
Thomson (R. Y.), Heagy (F. G.), Hutchinson (W. C.), Davidson (J. N.) — *Biochem. J.*, 1953, **53**, 460.
Turba (F.) et Hilpert (H.). — *Biochem. Z.*, 1961, **334**, 487.
Trump (B. F.), Goldblatt (P. J.) et Stowell (R. E.). — *Lab. Invest.*, 1962, **11**, 976.
Walder (A. I.) et Lunseth (J. B.). — *Proc. Exptl. Biol. Med.*, 1963, **112**, 496.

Walter (H.), Selby (F. N.) et Brake (J. M.). — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, **15**, 497.
Wassermann (F.). — *Z. Zellforsch u. mikroskop. Anat.*, 1958, **49**, 13.
Wattiaux (R.) et Duve (C. de). — *Biochem. J.*, 1956, **63**, 606.
Weiss (L.). — *Exptl. Cell Res.*, 1959, **17**, 499.
Winkler (K. C.) et Bundenberg de Jong (H. G.). — *Arch. Néerl. physiol.*, 1941, **25**, 431.
Wood (R. L.). — *Z. Zellforsch. u. mikroskop. Anat.*, 1963, **58**, 679.
Yamagishi (M.). — *Arch. Histol. Jap.*, 1959, **18**, 223.
Younger (J.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1954, **85**, 202.
Zamecnik (P. C.), Lottfield (R. B.), Stephenson (M. L.) et Stelle (J. M.) — *Cancer Res.*, 1951, **11**, 592.
Zimmerman (M.), Delvin (T. M.), Pruss (M. P.). — *Nature*, 1960, **185**, 315.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 13

PREMIERE PARTIE

Techniques d'analyse.

I. — *Analyses biochimiques* 17
II. — *Techniques manométriques* 23
III. — *Mesures des activités enzymatiques* 24
IV. — *Marquage isotopique et mesure des activités spécifiques* 25
V. — *Techniques de fractionnement des structures intracellulaires* 28
VI. — *Examens morphologiques* 28
VII. — *Analyse statistique* 29

DEUXIEME PARTIE

Méthodes personnelles de dispersion des cellules du tissu hépatique et leur fractionnement.

Chapitre I. — *La dispersion des cellules* 30
Chapitre II. — *Le fractionnement des cellules hépatiques en types et classes cellulaires* 42
Chapitre III. — *Contrôle des préparations* 49

TROISIEME PARTIE

Etude biochimique de l'hépatocyte isolé.

Chapitre préliminaire. — *La cellule, unité de référence en Physiologie cellulaire hépatique* 54
Chapitre I. — *Les effets de la perfusion sur le tissu hépatique* 59
Chapitre II. — *Données expérimentales concernant l'hépatocyte isolé* 67
I. — Composition chimique globale 67
II. — Composition des structures intracellulaires .. 68
III. — Examen de quelques activités enzymatiques .. 70
Chapitre III. — *Interprétation des résultats* 72

QUATRIEME PARTIE

Activités métaboliques de l'hépatocyte isolé.

Chapitre I. — *Respiration et glycolyse* 84
Chapitre II. — *Activités anaboliques des hépatocytes isolés* .. 95
I. — Synthèse protéique 95
II. — Synthèse d'acide ribonucléique 99
Chapitre III. — *Considérations sur l'intégrité des hépatocytes isolés et le problème de la perméabilité des membranes* 102

CINQUIEME PARTIE

Fractionnement des hépatocytes en classes de densité.

Etude sur le foie normal ou en hypertrophie compensatrice. Application au foie porteur d'hépatome.

Chapitre I. — *Caractères des classes d'hépatocytes isolés à partir du foie normal de Rats adultes* 105
Chapitre II. — *Etudes sur les classes d'hépatocytes du foie en hypertrophie compensatrice* 112
Chapitre III. — *Etude du fractionnement des hépatocytes isolés à partir de foies porteurs d'hépatomes* ... 120

Résumé et conclusions générales 126

Bibliographie 133

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

La cellule de Küpffer.

VU ET APPROUVÉ :
Paris, le 9 juin 1965.
Le Doyen
de la Faculté des Sciences.
MARC ZAMANSKY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
JEAN ROCHE.